UNIVERSITÉ de TOULOUSE

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1964 N° 24

CONTRIBUTION

à l'étude des Phospholipides de l'Encéphale

Travail effectué dans le laboratoire de Biochimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

Professeur : P. Valdiguié

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en avril 1964

par

Louis ARBUS

Interne des Hôpitaux
Assistant de Biochimie à la Faculté.

Membres du Jury : ....

MM.	VALDIGUIE	Président
	LAZORTHES	
	GERAUD	Assesseurs
	DARDENNE	
	DOUSTE-BLAZY	
	LABOUCARIE	Suppléant

UNIVERSITÉ de TOULOUSE

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1964 N° 24

CONTRIBUTION
à l'étude des Phospholipides de l'Encéphale

Travail effectué dans le laboratoire de Biochimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

Professeur : P. Valdiguié

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en avril 1964

par

Louis ARBUS

Interne des Hôpitaux
Assistant de Biochimie à la Faculté.

Membres du Jury : ....

MM.	VALDIGUIE	Président
	LAZORTHES	
	GERAUD	Assesseurs
	DARDENNE	
	DOUSTE-BLAZY	
	LABOUCARIE	Suppléant

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN.....MM. LAZORTHES
1er ASSESSEUR. BLANC
2me ASSESSEUR. SOREL
Doyens honoraires. GORSE, CALVET, LEFEBVRE BRUSTIER.

Professeurs honoraires. MM. RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BONHOURE. BUGNARD.

SECTION MÉDECINE - Professeurs

Clinique médicale.....MM.	MERIEL GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique.....	FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du Cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques...	BAZEX
Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.....	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires.	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture.....	SOREL
Clinique médicale de la première enfance.....	BARDIER
Clinique de neurologie et de psychiatrie	GERAUD
Clinique obstétricale..... ..	GUILHEM
Clinique Odonto-Stomatologique	CADENAT (H)
Clinique ophtalmologique...	CALMETTES
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale.....	CALVET
Clinique rhumatologique ..	RUFFIE (R.)
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU

Accouchement et obstétricie sociale.....MM.	PONTONNIER
Anatomie.....	LAZORTHES
Anatomie appliquée.....	POULHES
Anatomie pathologique.....	FABRE (J.)
Bactériologie, hygiène et médecine sociale.....	ANDRIEU
Chimie Biologique.....	VALDIGUIE
Electro-radiologie.....	MARQUES
Embryologie générale.....	BROUSSY (J.)
Histologie.....	BIMES
Hydrologie, thérapeutique et climatologie.....	DARNAUD
Médecine légale et du Travail.....	PLANQUES
Médecine Sociale.....	N.
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie Chirurgicale. ..	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale.....	SENDRAIL
Physico-Chimie	AUVERGNAT
Physiologie..... ...	LAPORTE (Y.)
Physiologie appliquée et Pharmacologie.....	BAISSET
Physique biologique et médicale....	N.
Propédeutique médicale....	LAPORTE (J).
Thérapeutique.....	DARDENNE
Clinique de neuro-chirurgie.	LAZORTHES.

Professeurs à titre personnel

Anatomie générale et comparée.....MM.	COULOUMA
Bactériologie .....Mme	ENJALBERT
Biochimie médicale..... MM.	DOUSTE-BLAZY
Médeine générale.....	MONIER.
Oto-Rhino-Laryngologie	CLAUX.
Pathologie médicale.....	BOULARD.
Pathologie chirurgicole.....	LAGROT.

Professeurs sans chaire

Histologie et embryologie... MM.	PLANEL
Ophtalmologie	DEODATI
Parasitologie	RUFFIE (J.)
Physiologie	MONTASTRUC
Physique médicale..... .	BRU

Maîtres de conférences agrégés

Anatomie..... .... MM	BASTIDE
Anatomie pathologique.....	BOUISSOU
Anesthesiologie	LARENG
Carcinologie	ESTRADE
Chirurgie générale.....	GÉDÉON.
Electroradiologie.....	PONS.
Hématologie.....	DUDOS.
Histologie et embryologie...	GUILHEM (A).
Pathologie expérimentale ...	GLEIZES
Physiologie	BESSOU.
Physique médicale.....	COMMANAY
Pneumo-phtisiologie.....	MIGUERES

SECTION MÉDECINE — **Agrégés**

Médecine générale	MM.	Ribaut
		Calazel
		Rascol
		Le Tallec
		Ribet
Chirurgie générale		Enjalbert
		Ficat
		Pasquié
		Souquet
		Sarrazin
		Gaubert
Dermatologie et syphiligraphie		Dupre
Hydrologie		Denard
Médecine légale et du Travail	MM	Grezes-Rueff
Neurochirurgie		Espagno (J)
Neurologie et psychiâtrie		Gayral
Obstétrique		Espagno (G)
Ophtalmologie		Bec
Pneumo-phtisiologie		Delaude

Agrégés libres

Anatomie	MM.	Thomas
Pathologie chirurgicale		Dieulafé

SECTION PHARMACIE - **Professeurs**

Botanique et Cryptogamie	Mme	Dulucq-Mathou
Chimie analytique toxicologie et hygiène industrielle	MM.	Bourbon
Chimie pharmaceutique		Blanc
Matière médicale		Vincent
Pharmacie chimique et pharmacodynamie		Caujolle
Pharmacie galénique		Stanislas
Zoologie		Roux

Professeur à titre personnel

Botanique	MM.	Roques
Pharmacie		Couturier
Sciences naturelles	Mme	Caujolle

Professeurs sans chaire

Microbiologie	MM.	Breuillaud
Sciences physiques		Pitet

Maîtres de conférences agrégés

Toxicologie		Broussy (G.)

Personnel administratif

Secrétaire principal	M.	Roche
Secrétaire	M.	Berrut

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

son souvenir restera toujours
présent, faible témoignage
de mon amour et de ma
reconnaissance infinis.

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MES FILS

A MON ONCLE, A MA TANTE

A MA BELLE FAMILLE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie Biologique

Chevalier de la Légion d'Honneur

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE DOYEN LAZORTHES

Professeur de la Clinique de Neuro Chirurgie
Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine
Neuro Chirurgien des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR GÉRAUD

Professeur de Clinique Neurologique et Psychiatrique
Médecin des Hôpitaux
Membre titulaire de la Société Française de Neurologie
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR DARDENNE

Professeur de Thérapeutique
Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

Professeur de Chimie Biologique

MONSIEUR LE DOCTEUR LABOUCARIÉ

Chargé de Cours à la Faculté

À Monsieur le Professeur RISER

Professeur Honoraire à la Faculté
Membre correspondant National à l'Académie de Médecine
Membre Honoraire de la Société Française de Neurologie
Commandeur de la Légion d'Honneur

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ
ET DE L'HOPITAL

A MES MAITRES DE CONFÉRENCE
D'EXTERNAT ET D'INTERNAT

A MES AMIS DE L'INTERNAT

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

AVANT - PROPOS

Au terme de ce travail, il nous est agréable de témoigner notre respectueuse reconnaissance à notre Jury de thèse, et aux Maîtres dont nous avons reçu l'enseignement.

Nous remercions tout d'abord, Monsieur le Professeur P. VALDIGUIÉ de l'accueil qu'il nous a réservé dans son Service et de la compréhension avec laquelle il nous a permis de recevoir une formation biochimique.

Il nous a donné quotidiennement l'exemple de ses grandes qualités de chercheur, alliées à une authentique vocation d'enseignant.

Nous souhaitons que ce travail dont il a été l'inspirateur et pour lequel il nous a souvent aidé par ses conseils soit pour lui le témoignage de notre gratitude.

Nous le remercions du très grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider cette thèse.

Monsieur le Doyen LAZORTHES a été notre premier Maître dans les Hôpitaux ; nous avons pu alors prendre conscience de la précision et de la clarté de son enseignement et admirer sa haute culture scientifique et son grand sens clinique.

Nous lui sommes particulièrement reconnaissant de la sollicitude généreuse et amicale qu'il a bien voulu nous manifester en plusieurs circonstances.

Nous le remercions vivement pour tout ce que nous lui devons et nous sommes fier de l'honneur qu'il nous fait en nous acceptant dans son Service.

Nous l'assurons de notre attachement le plus dévoué et le plus respectueux.

Monsieur le Professeur GÉRAUD nous entoure depuis de longues années de sa très compréhensive bienveillance.

Nous avons la chance d'être de ses élèves et d'avoir pu ainsi, au cours de nombreux stages d'Interne, bénéficier de sa grande connaissance du malade et de la richesse de son expérience neurologique.

Nous le remercions bien sincèrement de l'intérêt qu'il veut bien nous accorder depuis plusieurs années et l'assurons de notre respectueux dévouement.

M. le Professeur DARDENNE nous a accueilli dans son Service où nous avons beaucoup apprécié ses qualités humaines et la valeur de son enseignement clinique.

Nous avons été alors particulièrement sensible aux nombreuses marques de sympathie dont il a bien voulu nous honorer.

Nous le remercions avec respect d'avoir accepté d'être de nos juges.

M. le Professeur DOUSTE-BLAZY, nous a fait profiter durant la réalisation de ce travail, de sa grande expérience et de ses judicieux conseils. Ses contacts avec nous ont toujours été empreints d'une grande simplicité et d'une amicale gentillesse que nous avons grandement appréciées.

Nous le remercions vivement et le prions de croire à notre sincère reconnaissance.

M. le docteur LABOUCARIÉ nous a fait découvrir la psychiatrie clinique : son contact humain, sa clarté d'exposition, la précision et l'élégance de son vocabulaire, sont pour nous un sujet quotidien d'admiration.

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait aujourd'hui.

M. le Professeur RISER a été notre premier Maître. Nous n'oublierons jamais ses qualités prestigieuses de médecin et d'homme.

Nous dédions ce travail au « patron » bienveillant qu'il fût pour nous, et au chercheur qu'il a toujours été.

Nous remercions M. le Professeur BOULARD de nous avoir permis d'utiliser les pièces anatomiques des comas hépatiques.

Nos remerciements vont enfin à ceux qui dans le service de Biochimie nous ont aidé :

— M. le Professeur agrégé P. VALDIGUIÉ qui a bien voulu faire preuve à notre égard de sentiments très cordiaux, forgés à l'Internat. Nous avons été sensible aux encouragements qu'il nous a souvent prodigués.

— Le docteur LLOVERAS, Georges SOULA et J.-P. MOATTI, chefs de travaux, qui nous ont souvent aidé amicalement de leurs bons conseils.

— Le docteur G. CASTRO qui a bien voulu doser les ammoniémies de nos animaux d'expérience.

— Alain SAVY, externe des hôpitaux, ami dévoué et sûr, qui a été le collaborateur précieux de tous les jours.

— M^lle^ GRANEL qui nous a apporté un concours dévoué et particulièrement averti.

Enfin nous ne saurions oublier M. COURRECH dont les talents de dessinateur nous ont été si utiles.

INTRODUCTION

Les phospholipides du cerveau ont bénéficié au cours de ces dernières années d'un grand intérêt, justifié :

— par leur importance quantitative,

— par leur rôle dans le métabolisme cérébral.

Les procédés de fractionnement sur colonne d'acide silicique et la chromatographie en couche mince, nous ont semblé être des méthodes intéressantes pour étudier la répartition de ces phospholipides dans le cerveau normal.

Nous avons remarqué à la lumière des travaux antérieurs :

— que la présence de composés, tels les lysocithines, n'était pas affirmée dans le cerveau ;

— que certains autres tels les plasmalogènes étaient difficilement détectés sur les chromatographies.

Nous avons donc étudié plus particulièrement ces composés et les autres phospholipides à partir de cerveaux normaux et pathologiques.

Ces derniers ont été prélevés sur des sujets décédés de coma hépatique avec hyperammoniémie.

Enfin nous avons essayé de reproduire cette étiologie purement biochimique en étudiant le cerveau d'un chien chez lequel nous avions réalisé une hyperammoniémie expérimentale.

Travaux Antérieurs

— Depuis les travaux de THUDICHUM, en 1884 (172), de nombreux auteurs ont étudié les lipides du cerveau.

— En 1949, BRANTÊ (22) avait proposé une classification des lipides cérébraux faisant intervenir l'alcool constitutif. Il les nommait :

— Stéroïdes,
— Glycérides,
— Sphingolipides.

Au sein de ces deux derniers groupes (151) (152), on définissait ensuite :

— les diaminolipides : sphingolipides (PAGE, ROSSITER) (152).
— les monoaminolipides, comprenant les céphalines.

Mais FOLCH-PI et SPERRY (64) montrèrent que la céphaline primitive du cerveau était un mélange d'au moins trois phospholipides, ce qui rendait nécessaire une nouvelle classification.

Ces auteurs donnèrent alors le schéma suivant (65) :

Phospholipides (Phosphatides)

1) - Phosphoglycérides ;
— Phosphatidylcholines : lécithines,
— Phosphatidyléthanolamines,
— Phosphatidylsérines,
— Plasmalogènes (acétalphosphatides).

2) - Phosphoinositides ;

— Diphosphoinositides du cerveau.

3) - Phosphosphingosides ;
— Sphingomyélines.

La suite de la classification comprenait :

— les glycolipides : cérébrosides,
gangliosides,
strandine,
— les stéroïdes,
— les graisses neutres.

Mais les composés non phosphorés ne nous intéresseront pas.

Cependant ce schéma apparaît maintenant incomplet puisque ne faisant pas état de certains lipides phosphorés pourtant retrouvés dans les extraits de cerveau.

Pour cette raison nous adopterons la classification personnelle suivante :

I. — Glycérophospholipides ;

1) - Acides phosphatidiques.

2) - Céphalines :
a) - Phosphatidyléthanolamines,
- Phosphatidylsérines,
- leurs plasmalogènes,

b) - Phosphoinositides,
- Monophosphoinositides,
- Diphosphoinositides,
- Tri- et tétra-phosphoinositides.

c) - Lysocéphalines.

d) - Phosphatides à liaison éther.

3) - Lécithines ;
- Phosphatidylcholines,
- leurs plasmalogènes,
- lysolécithines.

II. — Phosphosphingosides :
- Sphingomyélines.

Même si nous modifions légèrement leur classification nous ne négligeons pas les connaissances qu'ont apportées les travaux de FOLCH et de son école. Ils ont été le point de départ d'une série de recherches concernant les phospholipides du cerveau.

A. - Distribution anatomique des phospholipides de l'encéphale

Jusqu'à ces dernières années, les travaux portant sur l'encéphale distinguaient les deux grandes zones : substance blanche et substance grise. Depuis quelques années à cette distinction macroscopique s'est ajoutée une étude microscopique.

a) MACROSCOPIQUE :

— La substance blanche et la myéline qui la constitue plus particulièrement avaient été surtout étudiées. Cette partie de l'encéphale avait montré sa grande richesse lipidique due beaucoup plus aux formations myéliniques péri-axiles, qu'aux quelques rares éléments cellulaires qui parsèment cette substance blanche.

— Dans la substance grise, riche en neurones, la richesse lipidique est moindre, la myéline étant inexistante. Il est d'ailleurs assez étonnant de constater que l'étude des phospholipides de la substance grise a surtout été effectuée aux dépens de la corticale, et bien peu aux dépens des îlots de

substance grise qui apparaissent au sein de la substance blanche.

Seul PAPADOPOULOS (133) a établi un fractionnement sur papier imprégné d'acide silicique, de phospholipides en provenance du Putamen, du Globus Pallidus, du Noyau Caudé et même du Cervelet.

Nous donnerons sur un tableau la quantité des différents phospholipides de la substance grise et de la substance blanche en gr.% de poids frais.

	% de Matière grise	% de Matière blanche
Lipides totaux (62) (100)	5,7	17,8
Phospholipides (30) (107)	3,85	6,3
Lécithines (86)	0,6 à 1,2	0,9 à 1,5
Phosphatidylsérines (38)	0,53 à 0,6	1,4 à 1,5
Plasmalogènes (145)	0,14 à 0,19	0,72 à 0,88
Phosphoinositides (22)	1,96	4,14
Monophosphoinositides (8) (38)	0,15	0,22
Sphingomyélines (38).	0,29	1,31

Nous remarquerons :

— qu'il existe deux fois plus de phospholipides dans la substance blanche et que cette différence est due en partie aux céphalines, plus particulièrement aux phosphoinositides, et surtout aux sphingomyélines.

— cependant cette division du cerveau en deux zones blanche et grise est devenue élémentaire et il est intéressant d'envisager maintenant les résultats obtenus grâce à des méthodes de séparation plus poussées permettant d'étudier la composition phospholipidique des fractions cellulaires et subcellulaires du système nerveux central.

b) MICROSCOPIQUE :

Réalisant une étape vers une meilleure compréhension du rôle des phospholipides, l'ultracentrifugation a permis de séparer en effet au sein de la matière grise les divers constituants cellulaires :

— Membranes cellulaires périphériques - Reticulum endoplasmique intracellulaire.

— Ribosomes.

— Mitochondries et microsomes.

Biran et Bartley (16), Nussbaum, Bieth et Mandel (129) ont par des méthodes de fractionnement sur acide silicique en colonne, étudié les lipides et plus particulièrement les phospholipides et acides gras de ces fractions subcellulaires.

On peut alors citer une nouvelle série de résultats donnés par ces auteurs :

— 26 mg de phospholipides pour 100 mg de matière sèche dans les mitochondries,

— 22 mg de phospholipides pour 100 mg de matière sèche dans les microsomes (c'est-à-dire membranes du reticulum endoplasmique et ribosomes).

D'après ces teneurs, les phospholipides (exprimés en moles pour 100 moles de phospholipides) se répartiraient de la manière suivante :

	Mitochondries	Microsomes
Phosphatides à sérine et éthanolamine	50	41
Lécithines	32	39
Inositol-phosphatides	13	12
Plasmalogènes	17	16
Lysophosphatides	15	13

Ce tableau montre la grande richesse en céphaline des granules et fait apparaître les lysophosphatides que les précédents auteurs ne mentionnaient pas, sans différencier cependant lysocéphalines et lysocithines *.

Enfin si nous envisageons maintenant l'étude chimique de la fraction microsomale, en nous référant aux travaux de WHERRET et MAC ILWAIN (183), nous constatons que les membranes sont bien plus riches en phospholipides que les granules. Il faut certes voir là une adaptation biochimique à la fonction physiologique de la membrane ; les phospholipides à caractère amphilyophile servant aux échanges ioniques cellulaires.

Les méthodes de fractionnement et d'étude des phospholipides sont basées sur leur nature chimique, sur leur solubilité. Ce sont les propriétés de chaque catégorie de phosphatides que nous envisagerons maintenant.

B. - Etude chimique des différents phospholipides du cerveau

I. — GLYCEROPHOSPHOLIPIDES.

Les plus simples sont les acides phosphatidiques.

1) Acides phosphatidiques :

Ce sont des acides diacyl-L alpha-glycérophosphoriques. Ils furent découverts par CHIBNALL et CHANNON (26) dans les feuilles de choux où on les retrouva en grande quantité.

En fait ils peuvent être le résultat d'une hydrolyse enzymatique due à la phospholipase C (71), mais ils sont aussi le point de départ de la synthèse in vivo des phospholipides ;

* Nous emploierons indistinctement les termes de lysocithine ou de lysolécithine.

ils sont donc très rapidement incorporés dans l'anabolisme et normalement ils ne sont trouvés dans les végétaux comme dans les organes animaux qu'à de très petites concentrations.

Leur isolement est très difficile en raison de leur instabilité en milieu acide. Le procédé le meilleur semble être le fractionnement sur colonne d'acide silicique où ils sont élués par les solvants très peu polaires (chloroforme-méthanol 15/1), le chloroforme ne les entraînant pas.

Leur synthèse réalisée par BAER et Coll (5), (6), (7) en même temps que celles des phosphatidylcholines et éthanolamines a montré l'appartenance de tous ces composés naturels à la configuration L.

En raison de leur instabilité et selon les méthodes utilisées les acides phosphatidiques ont été signalés dans le cerveau humain à des taux très variables (4). Cependant HOKIN et HOKIN (78), ont pu montrer leur rôle essentiel dans le transport du sodium. Récemment YAMAZOE et Coll. ont montré l'existence d'au moins deux acides phosphatidiques dans le cerveau de cobaye (187).

2) **Céphalines :**

THUDICHUM (172) donna le nom de « céphaline » à la fraction de phospholipides cérébraux soluble dans l'éther, mais insoluble dans l'alcool éthylique ; et pendant de nombreuses années on conserva ce nom de céphaline à des substances dont la formule correspondait à une diacylglycéryl-phosphoéthanolamine.

Mais FOLCH (60) montra que les céphalines contenaient au moins trois phospholipides, différenciés par leur solubilité différente : Phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et des composés contenant de l'inositol.

a) Phosphatidyléthanolamines :

Esters de l'éthanolamine et de l'acide phosphatidique, elles comporteraient des acides saturés (stéarique) et des acides insaturés (oléique) (48). Elles sont solubles dans l'alcool éthylique à l'inverse des autres constituants des céphalines.

En 1956 DEBUCH (43) dans une étude soigneuse des phospholipides à éthanolamine les isola du cerveau dans un grand état de pureté. Il montra que les acides gras étaient formés par 48,8 % de type saturé et par 51,2 % de type insaturé, ce qui témoigne de la complexité de la molécule.

Elles possèdent un groupement NH^2 libre sur la base, donc de ce fait sont colorables par la ninhydrine. Leur séparation des phosphatidylsérines a pu être réalisée soit selon la méthode chimique de MOORE et STEIN (125) soit par la chromatographie sur colonne d'acide silicique (19), soit par séparation à contre-courant (50), (28).

b) Phosphatidylsérines :

Ce sont des esters de la sérine et des acides phosphatidiques. Les acides gras sont principalement l'acide oléique et stéarique en proportions considérées comme équimoléculaires. Ce sont les stéaryl-oléyl-glycérylsérines.

Le cerveau contient sans doute de petites quantités de phosphatidylsérines possédant d'autres acides gras.

FOLCH avait isolé une phosphatidylsérine de pureté environ 92 % et, un peu plus tard, la synthèse d'un tel composé fut réalisée par BAER et MAURUKAS (7).

La molécule a un groupe basique libre, le groupe aminé de la sérine et présente donc comme la phosphatidyléthanolamine un groupement NH^2 qui peut être révélé par la méthode de Van SLYKE à la ninhydrine.

MARINETTI, ERBLAND et STOTZ (121) ont prouvé que les phosphatidylsérines du cerveau existent sous deux formes différentes :

— l'une où le groupement carboxylique est libre,

— l'autre où il est sous forme de sel de Na.

Une séparation de ces deux constituants a été effectuée par chromatographie sur acide silicique.

c) Phosphoinositides.

FOLCH et WOOLEY (65) furent les premiers à montrer qu'un composé contenant de l'inositol est présent dans la classique fraction Céphaline. Ce nouveau corps est moins soluble dans l'alcool méthylique que les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines. Ce phospholipide a un caractère acide ; isolé par fractionnement en solvant neutre, il se présente comme un sel de magnésium ou de calcium.

Ses constituants principaux sont : des acides gras, du glycérol, de l'inositol et du phosphore dans un rapport moléculaire de 2 : 1 : 1 : 2. Au cours de l'hydrolyse de cette substance, FOLCH (59) isola un inositolphosphate et l'identifia comme un inositol-métadiphosphate.

MAC KIBBIN (118) à partir du foie, FAURE, MORELEC-COULON (52) à partir du muscle cardiaque, montrèrent que certains phosphoinositides naturels étaient des diacyl-alpha-glycérylphosphoinositols ou mono-inositides.

HANAHAN et Coll. (73) isolèrent et purifièrent un monophosphoinositide à partir du foie de bœuf .

Ces composés se présentèrent sous forme de sels de Na, Ca, Mg ou K, et tout azote qui leur paraissait associé était considéré comme un contaminant.

Enfin, il convient de citer les travaux de HORAMMER (81), (82) qui parvint à montrer l'existence dans le cerveau de bœuf de tétra- et tri-phosphoinositides, ces derniers étant également retrouvés par DAWSON (48) dans le cerveau de rat.

Des phosphoinositides complexes ont été mis récemment en évidence dans le cerveau.

Klenk et Hendricks (95) isolèrent et hydrolysèrent un phosphoinositide de structure complexe, identifiant dans les produits d'hydrolyse une molécule de mannose ; celle-ci serait liée par une glucosamine à un tétra-phosphoinositide.

Un travail plus récent de Lebaron et Mac Donald (102) montre que la plus grande partie des inositides de la matière blanche de cerveau de rat est liée à des lipoprotéines.

La voie d'isolement la plus intéressante est constituée par le fractionnement sur colonne d'acide silicique. Mais en raison de la difficulté de séparation, on possède peu de renseignements quantitatifs sur les inositides. Si on se réfère toutefois aux chiffres donnés par Brante (22), il existerait 4,14 % de phosphoinositides dans la substance blanche et 1,96 % dans la substance grise.

Leurs propriétés chimiques ont été définies par Hanahan et Olley (73) après purification ; stables, ils peuvent être conservés longtemps ; moins oxydables à l'air que les autres lipides, ils ne sont pas hygroscopiques. Ils sont solubles dans le chloroforme et plus particulièrement dans le chloroforme méthanol 4/1 (108).

Ainsi on peut classer les composés phosphorés, contenant de l'inositol dans le cerveau, en trois parties :

— Di-phosphoinositides isolés par Folch,

— Mono-, tri- et peut-être tétra- inositides plus récents,

— Phosphoinositides complexes, appartenant, semble-t-il, surtout aux plantes (phytoglycolipides) (Carter et Coll.) (24), (25), mais retrouvés aussi chez les mammifères.

d) Lysocéphalines.

Il existe pour les céphalines, comme pour les lécithines, des composés lyso obtenus par perte d'une molécule d'acide gras en position alpha ou en position béta. Néanmoins, il ne semble pas qu'on ait prouvé leur existence de façon certaine dans les extraits de cerveau.

In vitro WEBSTER et THOMSON (182) ont pu désacyler les phospnatidylsérines et éthanolamines par incubation avec des tranches de cerveau ; KEENAN et L. E. HOKIN (90) ont montré la présence d'un lysophosphoinositol dans le pancréas de pigeon et ont ainsi confirmé l'hypothèse de HORAMMER et Coll. (82) selon laquelle le phosphoinositol B découvert par lui dans le cerveau de bœuf et coloré par le vert malachite etait un lysophosphatidylinositol.

Cependant ici encore, et c'est le mérite de KEENAN et HOKIN (90) de l'avoir souligné, rien ne prouve que la présence de ces lysophosphatidylinositols n'est pas le résultat d'une hydrolyse partielle se produisant durant le procédé d'isolement ou la chromatographie.

Les auteurs sont donc partagés en ce qui concerne les lysophosphatides du cerveau.

Certains retrouvent de tels composés dans les extraits de substance grise ou de substance blanche mais ceux-ci peuvent être des artèfacts produits :

— soit par la lyse enzymatique post mortem,
— soit au cours des techniques d'isolement,
— soit par action d'enzymes postérieure à l'isolement.

Toutefois, étant donné l'importance que de tels corps peuvent avoir dans le métabolisme du cerveau sain ou pathologique, le problème de leur existence reste posé à l'état normal.

e) Ether-phosphatides.

Il convient d'ajouter aux céphalines, un phospholipide contenant une liaison glycéryl-éther. Celui-ci fut découvert par CARTER (25) dans le jaune d'œuf. Dans ce cas, la base était de l'éthanolamine.

On suggéra que le lipide intact contenait un acide gras estérifié sur le groupe hydroxyle libre. Deux années plus tard, SVENNERHOLM et THORIN (165) isolèrent un dérivé semblable du cerveau humain dans la proportion de 1 à 2,5 % des lipides totaux. Les valeurs élevées étant retrouvées chez les sujets jeunes.

ANSELL et SPANNER (3) montrèrent qu'un lipide identique isolé du cerveau de rat contenait de l'éthanolamine comme base azotée.

Ces phosphatides à liaison éther ont les mêmes propriétés physiques (en particulier devenir chromatographique) que les lipides diacylés à éthanolamine.

Ceci a été mis en évidence à partir des éther-phosphatides, isolés des érythrocytes.

3) **Lécithines :**

a) Phosphatidylcholines.

Elles furent obtenues sous forme pure par LEVENE et ROLL (104), et PANGBORN (132) décrivit une méthode pour leur préparation.

Ce sont des esters de la choline et des acides phosphatidiques. Un des acides gras au moins est le plus souvent insaturé. Les principaux constituants sont les acides palmitique, stéarique, oléique et arachidonique.

Cependant THANNHAUSER et BONCODDO (167), (168), (169) isolèrent du cerveau un composé saturé : dipalmityl-

glycérylphosphorylcholine, soluble dans l'éthanol et l'acide acétique, mais seulement légèrement soluble dans l'acétone et insoluble dans l'éther.

L'étude aux rayons X a montré que la lécithine cristallisée se présente sous la forme d'une molécule complètement étendue, et à température ordinaire, arrangée en couches bimoléculaires, le grand axe de la molécule étant perpendiculaire au plan des couches (FINEAN) (55).

Le caractère essentiel de ces lécithines est la double opposition de leurs propriétés.

— D'une part, caractère amphilyophile de la molécule, dû à la nature différente des deux extrémités : glycéro-phosphoryl-choline hydrophile et chaînes d'acide gras polyméthyléniques ;

— D'autre part, double ionisation possible par le radical acide et par le radical basique.

b) Lysolécithines.

L'action in vitro de la phospholipase A sur les lécithines détache l'acide gras insaturé, fixé en position béta ou alpha, suivant l'origine des lécithines, pour former la lysocithine.

Au cours de ces dernières années, l'existence de petites quantités de lysocithines (50) a été rapportée dans les extraits lipidiques de plusieurs tissus de mammifères autres que ceux du système nerveux. Depuis le travail de DOUSTE-BLAZY (50), PHILLIPS (137), (138). la présence de lysocithines dans le sérum humain paraissant bien établie, il était intéressant de rechercher ces composés dans les extraits de cerveau en raison de leurs propriétés lytiques et aussi inhibitrices sur la synthèse de certains micro-organismes (174).

Ces propriétés lytiques ont été étudiées par plusieurs auteurs :

Grosse and Taubock. en 1942, avaient rapporté qu'un broyat de cerveau en suspension dans une solution saline pouvait être clarifié par la lysocithine.

En 1951, Ord and Thomson (130) décrivirent la possibilité qu'avaient certains agents chimiques de clarifier les surnageants opaques obtenus par centrifugation d'homogénats aqueux de cerveau de rats.

Enfin, un travail de Mac Ardle, Thompson et Webster (115), puis de Morrison et Zamecnick (126) montrèrent que « in vitro », phospholipase A ou lysolécithine mises à incuber avec des tranches de cerveau étaient capables de provoquer une lyse des cellules ou des membranes à l'origine d'une démyélinisation.

Marples, Thompson et Webster (124) justifièrent la lyse cellulaire due à la lysocithine par la libération d'enzymes à partir de l'homogénat (pseudocholinesterase, phosphatase alcaline, glycérylphosphorylcholine diesterase, protéinase et transaminase) ; toutes aussi actives que dans l'homogénat de contrôle.

On envisagea, à partir de ce travail, l'intervention des lysocithines dans certains processus de démyélinisation (Morrison et Zamecnick) (126) et plus particulièrement dans la sclérose multiloculaire (126). Mais ce n'était là qu'une hypothèse, car la lysocithine n'avait jamais été retrouvée jusque-là de façon constante dans un cerveau normal ou pathologique humain. En effet, les chiffres cités page 5 sont relativement récents. Seul Pighini, en 1931, avait obtenu à partir du cerveau un composé ayant certaines propriétés des lysophosphatides : solubilité dans l'alcool et insolubilité dans l'éther (139).

En 1960, Webster et Thompson (181), (182) firent la preuve de la présence de lysolécithine dans le cerveau humain, par fractionnement sur colonne d'alumine et chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Ils purent montrer égale-

ment la présence dans le tissu cérébral d'une petite quantité de phospholipase A, capable de former la lysocithine. Par contre, on ne retrouva pas de système enzymatique pouvant réacyler la lysocithine pour redonner une lécithine, selon le cycle court décrit par POLONOVSKI (140), processus se déroulant dans le foie de rat par exemple.

PAPADOPOULOS (133) établit une distinction entre substance grise et substance blanche montrant par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique qu'il existait des lysocithines dans la substance blanche et beaucoup moins dans la substance grise.

Mais la preuve formelle n'était pas faite pour autant. On reprocha à WEBSTER et THOMPSON de n'être plus en accord avec leurs travaux antérieurs et on attribua la formation de lysocithine à une hydrolyse sur colonne (122) ou à une libération enzymatique post mortem (88). Ces auteurs devaient alors montrer par chromatographie sur alumine d'une fraction de lécithine que celle-ci était retrouvée intacte au bas de la colonne ; ils la mettaient en évidence par chromatographie sur papier et dosage du phosphore.

Il n'en demeure pas moins vrai qu'aucun accord n'est fait sur la présence de lysocithine dans le tissu nerveux. PAPADOPOULOS (134) trouve des taux plus élevés dans la substance blanche — 7,5 % des phospholipides totaux — que dans la substance grise — 3,3 % seulement.

WEBSTER et THOMSON trouvent des taux plus faibles et ces auteurs pensent que cela est dû à ce que la fraction méthanolique, après élution sur colonne, contient des lysocithines et d'autres phospholipides. Celles-là ne représenteraient que 11 % de cette fraction.

Dans un travail récent, GALLAIS, MAGGE, THOMPSON et WEBSTER (69) ont étudié in vitro la formation de lysophosphatides. Ils font incuber du désoxycholate de lécithine à

pH 7,3 et à 38° en présence de préparations de cerveau et constatent au bout de 6 heures la formation de lysocithines et la disparition de 30 à 40 % de lécithines. De la même façon, ces auteurs ont montré la formation de lysophosphatidyléthanolamine ou sérine.

On peut se demander, après ce travail, si une importante quantité de lysocithine n'est pas due à une libération d'enzyme post mortem puisque aussi bien la quantité ainsi formée in vitro est bien supérieure à ce qui peut normalement exister dans le cerveau.

Cette question des lysocithines trouvées par certains, niées par d'autres reste un problème incomplètement résolu concernant les constituants phospholipidiques de l'encéphale.

4) **Plasmalogènes.**

La présence des plasmalogènes dans les tissus fut montrée par FEULGEN et ROSSENBECK en 1924 (54) à l'aide du réactif de SCHIFF. Par la suite, THANNHAUSER, BONCODDO et SCHMIDT (167), (168), (169), isolèrent l'aldéhyde palmitique et l'aldéhyde stéarique du cerveau de bœuf, tandis qu'ANCHEL et WAELSCH (1) purent mesurer la concentration des plasmalogènes dans le cerveau de veau et confirmèrent que ces plasmalogènes sont des phospholipides contenant un aldéhyde d'où leur nom d'acétalphosphatide.

RAPPORT et FRANZL (145) démontrèrent que « l'acétal » phosphoglycéride était en réalité dérivé du monovinyl éther, pouvant être représenté par la formule :

$$CHO — CH = CH — (CH_2)n — CH_3$$

Lors d'études récentes sur les plasmalogènes (146) l'hydrolyse montra qu'ils correspondaient à des dérivés phospho-glycérylés de l'éthanolamine ou de la choline, qui ont, en plus, une longue chaîne d'acides gras et surtout une chaîne « aldéhydogénique ».

On en retrouve de grandes quantités dans la myéline du cerveau et des nerfs (186) et les plasmalogènes à éthanolamine semblent être les plus abondants. Il existe des plasmalogènes des trois bases difficilement dissociables des phosphatidyléthanolamines, sérines et cholines.

Ces substances sont abondantes dans le cerveau et constituent une grande part de la fraction céphaline — plus de 50 % environ — et à quantité identique de phospholipides totaux, c'est la matière blanche surtout qui paraît la plus riche.

Ils sont mis en évidence par le réactif de SCHIFF et ont la solubilité des phospholipides aminés dont ils dérivent ; leur individualisation selon la base constituante est impossible sauf par fractionnement sur colonne d'acide silicique.

II. — SPHINGOMYELINES.

Les sphingomyélines furent découvertes dans le cerveau par THUDICHUM (173). Elles contiennent la sphingosine, apportant les groupements alcool. Les premiers travaux sur les sphingolipides, dus à THIERFELDER et KLENK (170) ont montré que la sphingomyéline contenait deux molécules d'azote pour une de phosphore dans un assemblage de sphingosine, acide phosphorique, choline, acide gras. C'est un composé stable en milieu alcalin.

On a retrouvé dans les sphingomyélines plusieurs acides gras; les quatre principaux étant : les acides lignocérique, nervonique, palmitique et stéarique. Jusqu'à ces dernières années l'acide nervonique (75) était le seul acide insaturé chimiquement caractérisé dans les sphingolipides.

CARROL a récemment identifié les acides gras à 22 C (80), et à 20 C (70) avec une double liaison en 9 = 10. Les auteurs rapportent avoir trouvé 27 acides insaturés. Mais ces

acides dérivent de l'acide oléique, palmitique et linoléique (93).

Comme pour les autres lipides complexes, les sphingomyélines isolées sont donc des mélanges de sphingomyélines, contenant chacune un acide gras qui peut être différent ou bien des mélanges complexes d'un certain nombre d'unités sphingomyéliniques.

Sweeley (166) a montré après isolement que l'acide palmitique était le principal constituant des sphingomyélines du plasma.

Les sphingomyélines isolées du cerveau contiendraient les acides lignocérique, nervonique et stéarique dans le taux 1-2-2 (166).

La sphingomyéline participe principalement à la formation de la myéline, nous la retrouverons au cours de l'étude du métabolisme cérébral des phospholipides et de leur répartition dans le cerveau selon l'âge.

Cette étude analytique paraissait nécessaire afin de comprendre la nature des différents phospholipides que l'on pouvait s'attendre à retrouver dans le cerveau humain. Si nous nous sommes surtout attaché à envisager les constituants particuliers : lysocithines, inositides, plasmalogènes, c'est en raison de leur connaissance encore limitée et du rôle qu'ils pourraient jouer, surtout les premiers, dans certaines étapes du métabolisme cérébral.

C - Répartition des phospholipides dans le cerveau selon l'âge

De nombreuses investigations ont été rapportées tendant à montrer la composition phospholipidique du cerveau selon l'âge, dans différentes espèces de mammifères et plus particulièrement chez l'homme. Ceci dans le but de déterminer les échanges qui se produisent durant la myélinisation, et de préciser le métabolisme de certains constituants. La myélinisation semble être, en effet, le problème métabolique majeur de la substance blanche.

Plusieurs auteurs ont étudié cette répartition suivant l'âge en adoptant la méthode de DAWSON (42) : chromatographie sur papier et dosage du phosphore lipidique. Ils ont montré que la myélinisation commence chez l'homme autour du quatrième mois de la vie intra utérine (KUNTZ, 1950) et s'arrête à la fin de la seconde année de la vie.

Ces faits ne sont pas applicables à toutes les zones du cerveau comme l'ont montré NATHAN et SMITH. D'autre part chaque groupe de phospholipides a une évolution propre selon l'âge.

JONHSON et Coll. (87), BRANTE (22) et BALAKRISHNAN (8), GOODWIN et CUMINGS (33) précisèrent que la quantité de lécithine est moindre chez le nouveau né que chez l'adulte.

CUMINGS signale que les céphalines ne subissent pas un grand accroissement avec l'âge.

Les sphingomyélines au contraire s'accroissent de la naissance à l'âge adulte en passant par un maximum vers l'âge de 14 ans (CUMINGS) (33).

Quant aux plasmalogènes, ils augmentent progressivement de l'âge foetal à l'âge adulte. MANDEL (14), (15), en étudiant l'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides du cerveau de rat montre que celle-ci passe par un maximum vers le quinzième jour, correspondant à la période d'accroissement la plus élevée de tous les constituants. KOREYS et ORCHEN (96) ont obtenu des résultats similaires. Cette incorporation est encore plus intense et élevée dans les plasmalogènes quelle que soit d'ailleurs leur base azotée. Comme le moment le plus intense de la synthèse des sphingomyélines se situe également aux environs du quinzième jour on peut en déduire l'importance des acétalphosphatides dans les gaines de myéline (BRANTÊ) (22).

Il est évident que ces processus de myélinisation dont la nature exacte nous échappe encore sont intéressants car ils sont le complément indispensable de l'étude du métabolisme des phospholipides dans le cerveau.

D'autre part ils montrent les propriétés fondamentales de la myéline dont le rôle précisé récemment dans le mouvement des ions s'harmonise parfaitement avec ses propriétés métaboliques. C'est une substance assez inerte ne subissant pas le « turn-over » habituel des autres phospholipides du cerveau conférant à la gaine de myéline une grande stabilité.

En résumé

Les phospholipides jouent un rôle essentiel dans le cerveau :

1°) Ce rôle est plastique : ils prennent une part prépondérante à la formation de la gaine de myéline et à la constitution de la cellule nerveuse ;

2°) Ce rôle est énergétique puisque les phospholipides interviennent dans les systèmes enzymatiques ; ils ont en particulier un rôle respiratoire puisque participant à la constitution de la Succinodéhydrase et de la cytochrome-oxydase (140), (143).

3°) Ce rôle est enfin dynamique :

— c'est le transport des acides aminés et des acides gras dans la molécule de lipoprotéine,

— c'est le transport des ions.

Folch (58) et Manery (119) ont montré que les phospholipides acides possèdent 20 % des sites « anioniques » du tissu cérébral. Les extraits usuels de ces phospholipides contiennent des cations univalents : Na et surtout K.

Cette fonction est nettement dévolue aux Phosphatidylsérines et aux Phosphatidylinositols qui ont un caractère nettement plus acide que les autres.

⁂

— Ces rôles majeurs justifiaient l'étude des phospholipides dans les cerveaux normaux et au cours de certaines perturbations métaboliques.

— Dans les cerveaux normaux :

les lysocithines sont rencontrées par certains auteurs, jugées absentes par d'autres. L'importance des fonctions que

peuvent avoir ces composés demandait que nous apportions une contribution à l'étude de cette classe de phospholipides.

— Dans les cerveaux de sujets décédés de coma hépatique :

une perturbation métabolique importante, génératrice de coma doit exister. Est-elle uniquement secondaire aux lésions hépatiques et à l'hyperammoniémie, l'organe primitivement et directement atteint étant le foie ?

L'ammoniaque circulante et la glutamine ont des rapports étroits avec le fonctionnement du système nerveux central.

L'ammoniémie et l'hyperglutaminémie ont sans doute une action directe sur l'encéphale mais elles pourraient aussi agir en perturbant d'autres métabolismes des cellules nerveuses, celui des phospholipides en particulier, dans la mesure où ceux-ci interviennent dans l'oxydo-réduction cérébrale.

Nous avons donc essayé de voir si ce coma hépatique pouvait s'accompagner de modifications des phospholipides cérébraux.

Travaux personnels

Nos recherches ont eu pour but :

1°) De retrouver dans le cerveau par une méthode de séparation chromatographique précise les différentes fractions phospholipidiques ;

3°) De comparer entre eux les constituants phospholipidiques de divers territoires de la substance nerveuse ;

3°) D'aborder à nouveau le problème des lysophospholipides cérébraux ;

4°) De rechercher d'éventuelles modifications de la composition phospholipidique de l'encéphale au cours d'affections génératrices de coma, témoignant d'une perturbation notable du mécanisme cérébral et par conséquent du métabolisme.

Nous avons pour cela utilisé un certain nombre de méthodes que nous décrirons sommairement.

Ces méthodes ont été appliquées à :

— des cerveaux de bœuf,

— des cerveaux d'adultes présumés sains,

— des cerveaux de sujets décédés au cours de coma hépatique avec hyperammoniémie.

Dans un dernier chapitre, nous avons essayé de réaliser par expérimentation des lésions cérébrales et nous avons étudié des cerveaux de chien sain, et de chien intoxiqué par l'hydroxylamine.

Nous exposerons ensuite les résultats de nos recherches et les conclusions qu'elles permettent de porter.

CHAPITRE PREMIER

Exposé des techniques

A. — Prélèvement.

Les différents constituants chimiques du cerveau risquent d'être altérés par de nombreux facteurs, dont l'action se situe entre l'instant de la mort et celui du début de l'extraction.

Les phospholipides risquent d'être plus particulièrement soumis à l'action des enzymes libérés par autolyse après la mort. Ces deux phénomènes résultant du vieillissement de l'encéphale peuvent être responsables :

— soit de la dénaturation de certains phospholipides,

— soit de la formation de nouveaux composés dus à l'hydrolyse enzymatique.

Pour ces raisons, les techniques de prélèvement et les conditions de conservation ont une importance fondamentale dans tout travail neurochimique.

Un moyen simple pour obtenir un cerveau intact est la formolisation. Utilisée couramment par les anatomopathologistes (104), elle consiste à injecter immédiatement après la mort une quantité suffisante de formol par la fente sphénoïdale et par voie atlo-occipitale. Il était permis de se demander si cette technique ne constituait pas un moyen commode d'éviter les modifications phospholipidiques post mortem.

Martha Wajda et Davison (38) ont étudié les différences qui apparaissent dans la composition des phospholipides de cerveaux frais et après formolisation (formol commercial et solution de ClNa à 0,9 % en proportion 1 v - 9 v).

Ces auteurs. en accord avec les travaux de Brante (1949), Cumings (1953, 1955), Rodnight (23), (31), (32), (149) mon-

trent que les taux de cholestérol et des cérébrosides sont les mêmes dans les deux cas mais par contre, pour aussi courte que soit la période de fixation, on constate une diminution de la teneur des phospholipides non choliniques.

Brantê (22) a prouvé que cette diminution se faisait aux dépens de la phosphatidylsérine. L'importance de celle-ci étant directement proportionnelle à la durée du séjour dans le formol. Ces notions interdisaient donc l'utilisation de cerveaux formolés.

S'il apparaît indispensable de travailler sur du matériel frais, l'existence d'un inévitable intervalle libre de vingt-quatre heures environ entre la mort et le prélèvement, risque de provoquer des modifications des phospholipides.

Aussi dans une expérience préalable, nous avons pratiqué des fractionnements comparatifs chez l'animal, en vue de déterminer les éventuelles modifications dans la teneur ou la nature des phospholipides, selon le mode de prélèvement.

I. — TECHNIQUE.

Nos cerveaux sont prélevés vingt-quatre heures après la mort, sur des cadavres placés jusque là en chambre froide à — 15°. Nous ne faisons intervenir aucun moyen de fixation. Après son prélèvement, le cerveau est mis dans un récipient réfrigéré et transporté ainsi au laboratoire afin d'être disséqué.

II. — DISSECTION.

Une coupe longitudinale interhémisphérique nous permet d'obtenir les deux moitiés de l'organe et le corps calleux peut être prélevé car il est très visible, sur la coupe, et se sépare très bien du reste de l'encéphale. Puis, par une série de sections transversales de demi en demi-centimètre, nous isolons une partie :

— de substance blanche sous-corticale,
— de substance grise corticale,
— de noyaux gris centraux.

Nous obtenons ainsi :

— 2 zones particulièrement riches en fibres nerveuses ou éléments de transmission,

— 2 zones riches surtout en corps cellulaires.

Ces différents éléments sont soigneusement libérés de tous fragments de méninges et des vaisseaux, puis lavés à l'eau distillée afin d'être débarrassés le plus possible des éléments du sang. L'eau enfin est éliminée au moyen de la trompe à vide et d'un entonnoir de BUCHNER.

Nous pesons alors une partie aliquote de chaque région ainsi prélevée et nous la fragmentons très finement afin de la soumettre à l'extraction.

Nous voulons insister sur l'importance d'une température relativement basse (+ 5°) lorsque ces différentes opérations sont faites. Pour cette raison, nous pratiquons toutes les manœuvres préliminaires à l'extraction en chambre froide à + 4°.

Ce procédé de prélèvement est sensiblement adopté par la majorité des auteurs.

B. — Extraction.

On sait que les lipides du cerveau sont liés à des protéines sous forme de cénapses lipidoprotidiques, selon MACHEBŒUF (113). Cela est encore plus vrai pour les phospholipides qui forment un lien entre protides et lipides. L'extraction des lipides doit donc couper les cénapses d'une part, puis entraîner selon leur solubilité les lipides ainsi libérés (114).

A cet égard, nous avons donné la préférence à la technique d'extraction des lipides cérébraux préconisée par FOLCH et LEES (63) mettant en jeu le couple de solvants chloroforme-méthanol dans une proportion chloroforme-méthanol 2 v : 1 v. (POLONOVSKI) (142).

I. — SOLVANTS.

Les solvants que nous utilisons sont rectifiés avant l'emploi :

— Le méthanol par adjonction de m-phénylène-diamine, 5 mg par litre. On laisse en contact pendant 24 heures, puis on rectifie. Le méthanol bout à 64° 5. On a ainsi un méthanol déshydraté (moins de 1 % d'eau) et libre d'aldéhydes.

— Le chloroforme RP est déshydraté sur chlorure de calcium anhydre.

II. — TECHNIQUE.

Chaque échantillon de cerveau est broyé durant dix minutes dans un mélange de chloroforme méthanol 1 v : 2 v puis laissé en contact pendant deux heures. Les proportions sont de 1 g. de matière fraîche pour 20 ml de solvant. Nous avons utilisé un broyeur du type P. Willemz.

Nous centrifugeons, nous conservons le surnageant. Le culot est alors repris par une quantité de mélange chloroforme-méthanol 1 v : 1 v dans les proportions précédentes puis après un nouveau broyage et une nouvelle centrifugation, le culot est enfin broyé puis centrifugé dans du chloroforme-méthanol 2 v : 1 v une dernière fois et le surnageant recueilli, ajouté aux deux précédents. Le culot est jeté.

Nous avons ainsi obtenu une solution dont le volume est égal à 60 fois le poids de matière fraiche. Cette solution est évaporée à sec et le résidu est repris par une quantité connue de solvant chloroforme-méthanol 2 v : 1 v (ceci pour préparer notre purification selon le procédé de Folch) puis filtrée.

Nous évaluons par pesée la quantité de lipides ainsi extraits. Nous mettons 0,5 ml de solution dans une capsule et nous évaporons sous vide jusqu'à poids constant. Par pesée différentielle nous obtenons donc le poids de lipides extraits d'une quantité connue de substance cérébrale fraiche tout en sachant qu'il existe des contaminants et des protéolipides entrainés par l'extraction.

Cette mesure est suffisante pour extraire la quasi totalité des lipides, à condition que le broyage soit suffisamment poussé, car elle fait intervenir un couple de solvants à destinée différente : le méthanol coupe les cénapses protéolipidiques tandis que le chloroforme est un solvant électif des lipides. L'association des deux solvants est donc très utile.

Cependant cette extraction entraîne certains contaminants, des protéolipides et il est nécessaire de faire subir un procédé de purification à l'extrait obtenu.

C. — Purification de l'extrait lipidique.

L'extrait lipidique est débarrassé des contaminants hydrosolubles par le procédé de FOLCH (63).

Son principe est basé sur l'affinité entre méthanol et eau plus grande qu'entre chloroforme et eau, les substances dissoutes dans le méthanol sont éliminées avec l'eau.

I. — TECHNIQUE.

Nous utilisons le procédé de FOLCH très légèrement modifié.

Nous plaçons une quantité connue de lipides, en solution dans le mélange chloroforme-méthanol 3 v : 1 v, dans un petit bécher de 4 cm de diamètre et de 10 cm de haut. Ce bécher va être rempli d'eau distillée. Il importe de laisser couler celle-ci très doucement sur les parois du bêcher. Pour réaliser cela nous avons remplacé la pipette qui ne donne pas d'écoulement régulier, par un goutte à goutte fixe qui ne transmet qu'une agitation très faible à la solution lipidique. Ainsi la séparation se fait de façon très satisfaisante.

Lorsque le bécher est plein d'eau, on a obtenu deux phases :

— l'une inférieure chloroformique,

— l'autre supérieure méthanolique et aqueuse.

A la partie inférieure de cette dernière se situe une émulsion, le « fluff », blanchâtre et paraissant vraiment séparer les deux phases.

Nous plaçons alors le petit bécher dans un grand bécher de deux litres plein d'eau, de sorte qu'il y ait une couche d'eau de 3 à 4 cm d'épaisseur au-dessus du bord supérieur du petit bécher. On couvre l'ensemble et on laisse se poursuivre les échanges de la phase inférieure vers la phase supérieure durant 24 heures à l'abri de la lumière et à température constante de + 4° maximum.

Dans la phase aqueuse et méthanolique vont passer tous les constituants non lipidiques, glucides, protéines, constituants minéraux et organiques qui souillaient encore l'extrait ; au niveau du « fluff » se disposent les protéolipides classés en trois fractions A-B-C par Folch (63), (58).

II. — SEPARATION DES PHASES.

Le fluff et la phase inférieure chloroformique sont intéressants :

— le premier contient les protéolipides,

— la seconde contient les lipides en solution.

Donc nous aspirons tout d'abord la phase aqueuse supérieure jusqu'à 1 mm environ au-dessus du fluff, il persiste une fine pellicule d'eau que nous rejetons pour ne pas perturber l'émulsion.

Nous pouvons alors utiliser :

— la phase chloroformique et le fluff ensemble,

— ou chacun séparément.

Lorsqu'on veut utiliser phase chloroformique et fluff, se pose le problème de l'homogénéisation des deux phases.

Pour cela on ajoute un volume de méthanol égal au quart du volume original de la solution lipidique. Si celui-ci n'entraîne par la solubilisation du fluff on ajoute encore du méthanol goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

Cependant le fractionnement ultérieur de cette solution sur colonne d'acide silicique nécessite une évaporation à sec pour éliminer le méthanol, la première fraction d'éluant étant chloroformique.

Mais lorsqu'on reprend le résidu par du chloroforme on obtient une phase non homogène qu'il faut filtrer ; ce qui aboutit pratiquement à l'élimination du fluff. Il est donc difficile de conserver cette émulsion lorsqu'on désire pratiquer un fractionnement sur colonne.

— L'étude des lipides de la phase chloroformique rend donc nécessaire l'élimination de cette interphase.

Ceci est réalisé par la congélation.

Après aspiration de la phase aqueuse on place le bécher contenant phase chloroformique et fluff à — 15° pendant six heures. Il se produit alors une congélation de l'eau de l'émulsion.

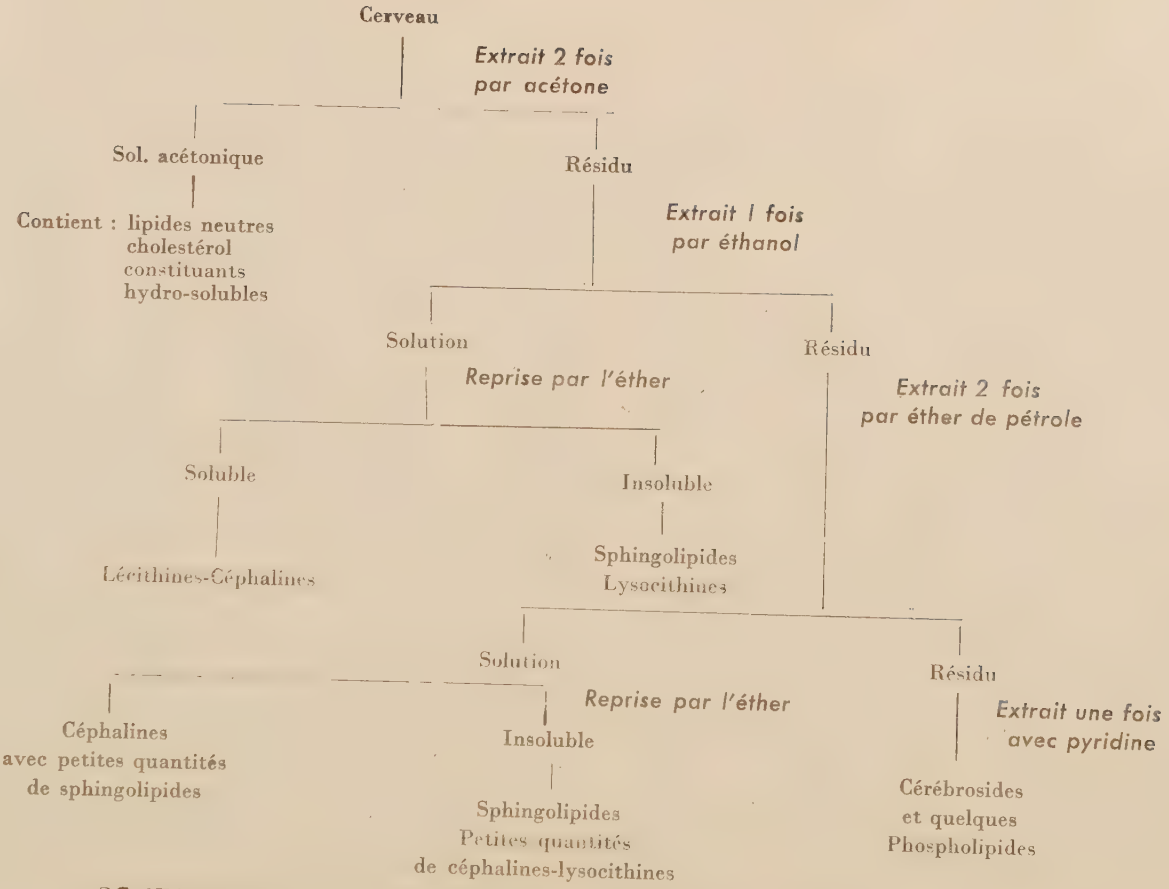
Par filtration sur papier sans cendres en chambre froide on obtient une phase chloroformique limpide ; et il suffit de reprendre le fluff par du méthanol pour obtenir celui-ci en solution méthanolique.

La phase chloroformique est ensuite évaporée et le résidu est repris par une quantité aliquote de chloroforme pur pour analyse et est ainsi prête au fractionnement sur colonne.

Nous venons de montrer les difficultés que l'on rencontre pour séparer la phase chloroformique du fluff qui la surmonte. Notre modification utilisant l'addition goutte à goutte d'eau distillée favorise cette séparation.

Les lysocithines étant solubles dans l'eau on peut redouter qu'elles soient entraînées dans la phase aqueuse.

— Cependant leur solubilité étant plus grande dans le chloroforme et la quantité d'eau n'étant pas très importante elles restent dans ce solvant à condition toutefois que le mélange ne soit agité ni par mouvements imprimés au bécher ni par la chute des gouttes d'eau dans la phase inférieure.



SCHEMA POUR L'EXTRACTION FRACTIONNEE DES LIPIDES.
TABLEAU DE MAC ILWAIN (N° I) (117).

D. — Isolement des phospholipides.

Deux procédés physico-chimiques d'isolement ont retenu notre attention :

— Méthode utilisant la propriété qu'ont les phospholipides d'être insolubles dans l'acétone.
— Fractionnement par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

I. — PRECIPITATION PAR L'ACETONE.

Elle peut être réalisée suivant deux méthodes principales :

1°) En broyant le cerveau en présence d'acétone, l'extraction des lipides neutres est alors obtenue avec le couple éthanol-éther de pétrole, à partir du résidu insoluble.

2°) Nous avons préféré traiter les lipides par l'acétone après leur extraction par le couple chloroforme-méthanol. Après évaporation de ces solvants, le résidu est mis en présence d'acétone purifiée anhydre et laissé en chambre froide à — 15° pendant 24 heures. Nous renouvelons une fois l'opération ; le précipité acétonique est isolé et redissous dans du chloroforme (Polonovski (141) et Lebaron (101).

Ce procédé peut être utilisé :

— soit pour purification préalable avant le fractionnement sur colonne.
— soit pour l'isolement, selon leur solubilité, de certains phospholipides à l'état pur, pour l'obtention de témoins chromatographiques.

En effet, en nous référant au tableau I nous constatons les possibilités d'isolement des phospholipides majeurs.

C'est là un schéma d'extraction particulièrement bien conçu mais moins intéressant que le fractionnement sur colonne d'acide silicique. Celui-ci nous paraît avoir trois avantages importants :

1°) Eviter la perte de phosphatides acétono-solubles ;
2°) Donner des fractions plus purifiées ;
3°) Obtenir tous les phospholipides cérébraux.

En effet c'est tout d'abord l'extraction et l'isolement par précipitation acétonique qui présente des inconvénients, ainsi :

— Le précipité contient de petites quantités de glycérides et d'acides gras libres comme nous avons pu le mettre en évidence par chromatographie.

— De plus, l'acétone entraîne en solution une quantité de phosphatides plus ou moins grande que les auteurs évaluent de manière différente :

— Borgstrom (20) ne fait que citer cette perte phosphatidique,

— Barron et Hanahan (72) l'évaluent à 4 %,

— Favarger (53) pense que 8 à 15 % des phospholipides sont solubilisés avec les glycérides par l'acétone,

— Enfin, dans des travaux encore plus récents, Lucas et Patterson (110) ont retrouvé effectivement la présence de 25 % de phospholipides acétonosolubles dans le cerveau et jusqu'à 50 % dans d'autres organes.

Ces auteurs rendent responsables de cet excès de solubilité les acides gras polyinsaturés présents dans certaines molécules de phosphatides.

Dans le tableau de Mac Ilwain les fractions obtenues sont des mélanges de constituants.

Certaines substances comme les inositides ne sont pas mentionnées. Nous n'avons donc pas coutume d'utiliser cette technique en raison de ces pertes de phospholipides dans la solution acétonique ; mais nous avons préparé de la sorte certains de nos corps témoins, en augmentant leur pureté par entraînement sur colonne d'acide silicique à l'aide d'éluants appropriés, comme nous le verrons plus loin.

Nous avons préféré fractionner sur colonne d'acide silicique l'extrait chloroformique total purifié par le procédé de Folch

II. — FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE.

De nombreux adsorbants ont été utilisés pour fractionner les lipides sur colonne.

LEA and RHODES (1953) (99), SMITH (1954) (162), SVENNERHOLM (1956) (165), ont employé la cellulose pour déplacer des lipides les substances solubles dans l'eau et obtenir des gangliosides.

RADIN et Coll. (1955) (144) et KISHIMOTO et RADIN (93), ont séparé les lipides sur silicate de magnésium.

ROUSER et Coll. (1960) (155) (156) ont pu séparer sur colonne de DEAE-cellulose les lipides acides retenus par les échangeurs d'anion, des lipides non acides.

Martha WAJDA et DAVISON (39), WEBSTER et THOMPSON (182), ont utilisé des colonnes d'alumine.

Mais les meilleurs fractionnements semblent être réalisés par les colonnes d'acide silicique préparées :

— soit selon la méthode de ROUSER : Acide silicique-silicate-eau ;

— soit selon la technique décrite par BORGSTROM (19) (20) puis utilisée par HAHANAN, BARRON et OLLEY (73) et dans un but de microfractionnement par LIS et Coll. (106).

C'est cette dernière que nous avons utilisée et que nous décrirons.

a) Matériel.

Nous utilisons une colonne de 1 cm de diamètre intérieur sur 30 cm de hauteur, munie d'un réservoir supérieur, avec possibilité d'appliquer une pression positive d'azote à la partie supérieure ou d'aspirer à sa partie inférieure.

La colonne présente à son extrémité inférieure, avant le robinet terminal, un verre fritté de porosité G 1 qui doit être maintenu en parfait état de propreté car sans cela il gênerait considérablement l'écoulement.

Nous plaçons un tampon de laine de verre dégraissée sur le verre fritté de la colonne pour éviter son oblitération par les fines particules d'acide silicique.

Nous nous servons, pour préparer notre colonne d'adsorbant, d'acide silicique Mallinckrodt - 100 mesh - préalablement activé par un séjour de 24 heures à 110°.

L'acide silicique peut être utilisé seul, mais le fractionnement est alors très long. Pour l'accélérer on peut laver plusieurs fois l'acide silicique par le méthanol en éliminant chaque fois la phase supérieure contenant les fines particules.

Nous préférons mélanger l'acide silicique à l'hyflo-supercel dans la proportion 2 poids : 1 poids ce qui permet d'augmenter la rapidité de l'élution (BORGSTROM) (18).

Ce mélange est fait dans le chloroforme qui est notre éluant de départ.

b) Préparation.

Nous versons notre adsorbant, en suspension dans une quantité de chloroforme égale au volume de la colonne, et pour éviter que la pesanteur ne fasse sédimenter l'acide silicique plus lourd à la partie inférieure, nous aspirons par le bas au moyen d'une trompe à vide pour obtenir une sédimentation homogène.

Lorsque l'adsorbant est tassé, nous fermons le robinet inférieur et nous supprimons le vide. Après ouverture du robinet l'écoulement reprend de façon régulière et nous lavons la colonne successivement avec les solvants indiqués par POLONOVSKI (141).

— méthanol 50 ml,
— Ether de pétrole 50 ml,
— Chloroforme 50 ml.

c) Fractionnement.

Nous pesons 200 mg de lipides correspondant à 1/50 du poids d'acide silicique. Ceux-ci en solution dans un minimum de solvant chloroformique (3 ml) sont déposés à l'aide d'une pipette sur la surface de la colonne.

La charge de la colonne est accélérée par l'intervention d'une pression d'azote, qui évite également l'oxydation des lipides déposés.

L'élution est assurée par le chloroforme puis par une série de mélanges : chloroforme progressivement enrichi en méthanol.

Le volume de chaque fraction est de 100 ml.

La phase chloroformique pure est destinée à débarrasser l'extrait des graisses neutres, glycérides et stérides.

Les mélanges de chloroforme et méthanol ont les proportions successives suivantes : 15 v - 1 v, 12 v - 1 v, 7 v - 1 v, 4 v - 1 v, 5 v - 2 v, 5 v - 4 v, 1 v - 1 v, (POLONOVSKI) **(141).**

L'action séparatrice de ces mélanges tient à la différence de polarité des phospholipides : à éluant plus polaire correspondant l'élution de phospholipides de plus en plus polaires.

Nous terminerons l'élution par une phase méthanolique pure.

WEBSTER et THOMPSON (182) ajoutent 4 % d'eau distillée au méthanol. Nous n'avons pas obtenu ainsi de résultats meilleurs.

Il est bon que cette fraction soit de quantité suffisante pour entraîner tous les phospholipides restant sur la colonne.

Nous appliquons sur la colonne une pression d'azote constante de l'ordre de 1/4 de kg par cm^2 entraînant un écoulement de 100 ml pour 1 h. 15 environ. Il faut augmenter légèrement cette pression au fur et à mesure de l'enrichissement des mélanges en méthanol.

Cette pression positive est à notre sens supérieure à l'aspiration par le vide. Cette dernière favorise la production dans la colonne de courants d'élution qui nuisent à un fractionnement homogène.

Nous n'utilisons le vide que pour la confection de la colonne. Chaque fraction recueillie est immédiatement traitée.

Elle est divisée en deux parties :

— l'une de faible volume constitue la prise d'essai sur laquelle sera effectué le dosage de P ;

— l'autre partie restante est concentrée 50 à 100 fois par évaporation afin de servir à la chromatographie sur papier ou en couche mince.

A condition de respecter ces données, et d'utiliser des éluants purs et déshydratés,la chromatographie sur colonne d'acide silicique est un excellent moyen de fractionnement préalable, étape indispensable, avant l'identification par chromatographie sur papier ou en couche mince.

E. — Estimation quantitative des phospholipides.

Nous avons pratiqué systématiquement le dosage du phosphore lipidique. La connaissance de sa teneur permet une appréciation de la quantité de phospholipides contenue dans chaque fraction. Mais il ne s'agit là que d'une appréciation.

Car LABBÉ et FABRIKANT (97) dans un article ancien déjà, ont critiqué le fait qui consiste à multiplier par 25 la teneur du phosphore pour obtenir la quantité de phospholipides, ce qui peut être exact pour les lécithines, mais sûrement pas pour les autres phospholipides et en particulier les phosphoinositides, où il peut exister un, deux, trois au quatre radicaux de PO_4H_3 par molécule.

Par contre ce dosage offre la possibilité de juger de la bonne marche du fractionnement sur colonne et de comparer la somme du phosphore des différentes fractions à la teneur en phosphore de la charge initiale.

Il sert de base quantitative à la réalisation de la chromatographie sur papier ou sur plaque permettant de préciser la quantité de prise d'essai.

Dosage du phosphore organique.

Ce dosage est difficile à réaliser en raison des faibles teneurs en phosphore de nos échantillons.

On ne peut appliquer ici les méthodes volumétriques décrites par MACHEBŒUF (111) (112), JAVILLIER et DJELATIDES (85) permettant de doser avec précision des quantités de phosphore de 100 μg à 1.000 μg.

Nous utilisons la méthode suivante :

Les prises d'essai contenant approximativement de 5 à 35 μg de phosphore sont évaporées au nid chauffant, à chauffage modéré pour éviter les projections.

Pour la minéralisation nous utilisons d'après BAUMAN l'acide sulfurique concentré et l'eau oxygénée. Après évaporation à sec nous ajoutons 0,5 ml d'acide sulfurique concentré et nous laissons au nid chauffant pendant une heure, puis nous ajoutons une goutte d'eau oxygénée à 110 volumes (162 bis), car si on se sert d'eau oxygénée à 30 %, (FISKE et SUBARROW) (56), on doit ajouter plusieurs gouttes pour obtenir une coloration franche. Dès le moment de la minéralisation on place un petit entonnoir sur les tubes afin d'éviter toutes pertes.

Lorsque la décoloration de nos tubes est complète nous les plaçons à incuber durant quatre heures au nid chauffant, à chaleur modérée (50 à 60° env). Ce temps est nécessaire pour décomposer entièrement l'eau oxygénée en excès.

Nous ajoutons ensuite 8 ml d'eau bidistillée en rinçant l'entonnoir et portons les tubes au bain marie bouillant durant vingt minutes pour transformer l'acide pyrophosphorique éventuellement formé au cours d'une surchauffe en acide orthophosphorique seul dosé (DELSAL et MANHOURI) (44).

La suite du dosage demande une élimination parfaite de toute trace d'eau oxygénée, ce qui est obtenu par le permanganate de potassium en solution centinormale.

Si le chauffage n'a pas été suffisamment poussé, il faut ajouter de nombreuses gouttes de MnO_4K pour obtenir la teinte rosée témoin de la disparition d'H_2O_2.

La solution redevient incolore par addition d'autant de gouttes d'oxalate d'NH_4 en solution centinormale que de gouttes de MnO_4K.

Le dosage se fait ensuite par colorimétrie (BRIGGS).

Nous ajoutons 2 ml de molybdate d'ammonium à 5 % qui entraîne la formation d'un complexe réduit par :

— 1 ml d'hydroquinone à 1 %,
— 1 ml de sulfite de Na à 20 %.

Après agitation, nous laissons reposer durant 45 minutes et nous lisons la coloration au spectrophotomètre : filtre rouge orangé à 635 mμ.

Une gamme, établie en parallèle, permet d'apprécier la valeur de chaque essai.

Le dosage du phosphore permettra de connaître la teneur en phospholipides de chaque fraction et d'évaluer la quantité de prise d'essai que nous devons utiliser pour la conduite de la chromatographie permettant l'identification des phospholipides.

F. — Séparation des phospholipides.

Notre but était d'identifier les phospholipides du cerveau par fractionnement sur papier imprégné d'acide silicique et sur chromatographie en couche mince.

Nous avons utilisé les deux procédés tout en donnant rapidement la préférence à la seconde méthode pour des raisons que nous exposerons plus loin.

1) *Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique.*

Elle fut mise au point et décrite par MARINETTI (123).

La partie la plus difficile est la préparation des feuilles. L'imprégnation des papiers se fait selon la technique de LEA et RHODES (98), (99), de MARINETTI (123) et POLONOVSKI (142) par passage successif dans des bains de silicate de sodium et d'HCl 6N. Les feuilles sont lavées pour être débarrassées de toute acidité, puis séchées.

Nous utilisons comme chambre de chromatographie des bocaux cylindriques de 45 cm de haut et de 25 cm de diamètre.

Les prises d'essai sont déposées à 3 cm du bord inférieur de la feuille et contiennent environ 3 μg de phosphore. Les feuilles enroulées sont ensuite posées verticalement sur le fond du bocal et recouvertes par un bocal semblable.

Les solvants ont été placés dans la cuve, au moins 24 heures avant la chromatographie afin de saturer l'enceinte. Nous utilisons comme solvant le mélange suivant, proposé par MARINETTI (120) :

— Di-isobutylcétone : 40 vol.
— Acide acétique : 25 vol.
— Eau : 5 vol.

La cuve est mise à l'obscurité, placée à température constante : 22°. La migration dure de 16 à 18 heures. La révélation se fait en imprégnant la feuille de Rhodamine 6 G. à 0,001 g %. Cette technique est exposée plus loin.

Cependant, les mêmes méthodes spécifiques de révélation peuvent être appliquées à la chromatographie sur papier comme à la chromatographie sur plaque. Nous les envisagerons ultérieurement.

2) Chromatographie sur plaque imprégnée d'acide silicique.

Nous avons bénéficié, dans la réalisation de cette partie de notre travail, des renseignements expérimentaux apportés par les travaux que J.-L. LEGRAND a fait dans le service (103).

— La première condition est l'extrême propreté des plaques qui sont dégraissées à l'éther.

Nous utilisons ensuite un appareil CAMAG qui a l'avantage de permettre des variations d'épaisseur de la couche de silicagel.

Nous revêtons les plaques d'une couche de silicagel de 0,5 mm d'épaisseur, une épaisseur moindre ne nous donnerait pas de résultats aussi favorables.

Nous activons les plaques par un séjour à l'étuve de 110° pendant 30 minutes avant l'emploi.

Les prises d'essai sont déposées à 2 cm du bord inférieur de la plaque, à 2 cm de distance l'une de l'autre. Chaque spot ne doit pas dépasser 5 mm de diamètre.

— Nous utilisons comme solvant le mélange :

Chloroforme R.P.	60 ml
Méthanol distillé	30 ml
Eau distillée	6 ml
Acide acétique	1 ml

qui doit saturer la cuve parallèlipipédique dont nous nous servons.

La chromatographie ascendante est réalisée en 45 minutes environ. La plaque est alors séchée à l'étuve à 110° puis révélée au moyen du réactif choisi.

3) *Avantages et inconvénients des procédés de chromatographie utilisés.*

La chromatographie sur papier, que nous avons utilisée au début de notre expérimentation, présentait l'avantage, outre l'obtention d'une bonne séparation des spots, de pouvoir être préparative car le découpage des taches permettait l'élution ultérieure pour reconnaître la substance. Elle favorisait l'utilisation de techniques de révélation nécessitant un lavage ultérieur.

Par contre, elle présentait certains inconvénients :

— la longueur et la difficulté de la préparation des feuilles,

— la longue durée de la chromatographie : 18 heures,

— la fugacité relative des taches de Rhodamine, visibles seulement en lumière U. V.,

— et la difficulté de leur relevé, devant se faire sur le chromatogramme encore mouillé.

Les inconvénients de la chromatographie sur plaque d'acide silicique sont certes moins importants :

— on ne peut pas utiliser une technique nécessitant un bain dans un solvant ou un lavage à l'eau distillée en raison de la fragilité de la couche, mais l'usage de réactifs vaporisés compense ce mince désagrément ;

— on ne peut pas effectuer l'élution des taches pour une meilleure identification, car même après prélèvement de la zone où se situe le spot, il est très difficile de détacher le phospholipide de son adsorbant.

Malgré cela, la chromatoplaque reste un excellent moyen d'identification des phospholipides (H. WAGNER) (177),

— rapide,

— de réalisation relativement simple,

— fidèle sous réserve d'une bonne technique,

— facilement photographiée, la plaque conserve ses colorations pendant 24 heures environ, ce qui permet une identification aisée des différents groupes de phospholipides.

G .— Détermination qualitative des phospholipides.

Deux moyens nous ont permis l'identification des divers phospholipides :

— la coloration par des réactifs spécifiques,
— la migration en parallèle sur la même plaque de substances témoins et des corps à identifier.

Nous étudierons tout d'abord un certain nombre de réactifs d'identification. Ils nous ont donné des indications précieuses mais leur défaut de spécificité ne permet de caractériser que des groupes de phosphatides.

I. — COLORATIONS SPECIFIQUES.

Nous avons successivement utilisé :

1) des méthodes visant à mettre les lipides en évidence :
   — Rhodamine 6 G,
   — Réactif Phosphomolybdique.

2) des méthodes plus spécifiques :
   — Réactif de HANES-ISHERWOOD,
   — Coloration à la ninhydrine,
   — Réactif de SCHIFF,
   — Réactif de DRAGGENDORFF,
   — Réactif de SCHERER.

1) Mise en évidence des composés lipidiques.

a) Coloration par la Rhodamine 6 G.

Elle est surtout employée dans la chromatographie sur papier car sa technique nécessite un lavage à l'eau courante.

La feuille après séchage est placée dans le bain de Rhodamine durant 6 minutes puis lavée pendant 1 heure à l'eau courante.

Les spots de phospholipides ont une fluorescence vert jaune sur fond rose en lumière U. V. Il faut les marquer rapidement car ils s'estompent très vite ; en particulier, si la séparation entre sphingomyélines et lysocithines est bonne, les taches de lysocithines diffusent en 2 ou 3 heures.

La rhodamine 6 G peut aussi être vaporisée sur plaque donnant la même fluorescence (WAGNER et Coll. (179), KAUFMAN (89).

b) Réactif phosphomolybdique.

On se sert d'une solution d'acide phosphomolybdique à 15 % dans l'alcool à 95° pour vaporiser les plaques de chromatographie, après leur séchage à l'étuve à 110°.

Un nouveau séjour à l'étuve fait apparaître, après environ 20 minutes, les spots de phospholipides, bleus sur fond jaune, les taches de lysocithines sont très longues à apparaître (35 à 40 minutes).

2) Détection de certains groupes particuliers.

a) Phosphore lipidique.

Nous utilisons le réactif de HANES-ISHERWOOD.

Sa composition est la suivante :

—	Molybdate d'Ammonium 4 %	25 ml
—	HCl N	10 ml
—	Acide perchlorique 60 %	5 ml
—	Eau distillée	100 ml

Ce réactif colore électivement le phosphore sous forme de taches bleutées, par pulvérisation sur le chromatogramme, lorsqu'on s'adresse à la chromatographie sur papier. Par contre, nous avons pu remarquer que sur plaque sa spécificité est moins bonne.

b) Phosphatides aminés.

Détectés par vaporisation de ninhydrine en solution à 0,2 % dans l'acétone ou le N butanol saturé d'eau.

La coloration pourpre sur fond blanc après passage à l'étuve à 80° pendant quelques minutes caractérise le groupe-groupement aminé NH_2.

c) Acétalphosphatides ou plasmalogènes.

Ils peuvent être caractérisés de deux façons :

— soit par la 2-4 dinitrophénylhydrazine. En pulvérisant sur le chromatogramme une solution à 1 % de cette substance dans HCl 2N, il se produit une coloration brunâtre sur fond bleu (Reitsemia (147), Skipski (160), (161) et Demole (45), (46).

— soit par le réactif de Schiff, selon la technique préconisée par Mandel (14). Nous lui avons donné la préférence.

On dissout à chaud :	Fuchsine basique	1 gr,
	Eau distillée	200 ml.

Après refroidissement à la température du laboratoire, on ajoute :

Bisulfite de soude à 30 % 3,5 ml

On bouche le flacon et on laisse reposer 24 heures à l'obscurité. On filtre sur charbon végétal et on ajoute :

HCl : 2N 20 ml

La décoloration est complète en 24 heures.

Les plasmalogènes se présentent sous une coloration rose violacé sur fond rose.

d) Choline.

Est mise en évidence par le réactif de DRAGGENDORFF (SCHLEMMER) (158). On mélange extemporanément les deux solutions :

Solution I

$(NO_3)_3$ Bi, 5 H_2O	1,7 g
CH_3 COOH 20 %	100 ml

Solution II

I K	40 g
Eau distillée	100 ml

Au moment de l'emploi on opère la dilution. :

— Solution I	4 ml
— Solution II	1 ml
— Eau distillée	20 ml

A la température du laboratoire, la vaporisation de ce mélange entraîne l'apparition d'une teinte rouge pourpre en présence de choline libre et une teinte jaune pour les dérivés choliniques.

e) Inositides.

Nous avons essayé d'appliquer aux chromatoplaques la technique d'identification proposée par FLEURY, COURTOIS et MALANGEAU (57) pour chromatographies sur papier.

On soumet la plaque à une pulvérisation de réactif de MEILLIÈRE.

— Oxyde mercurique		1 gr.
— Acique Nitrique		10 gr.
— Eau distillée	qsp	200 ml.

On le dilue avant l'emploi comme suit :

Réactif	30 ml
Eau	90 ml

On pulvérise le réactif puis on place la plaque à l'étuve à 110° pendant dix minutes. On fait une nouvelle pulvérisation et on replace la plaque à l'étuve cinq minutes.

On pulvérise alors une nouvelle solution :

— Acétate de Ba à 10 %		15 ml
— Acide Acétique RP	qsp	100 ml

Après un séjour à l'étuve de 2 minutes, on effectue une nouvelle pulvérisation et on remet à nouveau la plaque à l'étuve ; on répète l'opération six fois au moins. Les inositides apparaissent sous la forme d'un spot rose saumon sur fond blanc.

Cependant cette réaction n'est sensible qu'à 10 μg au moins d'inositol et c'est là une difficulté qui nous a longtemps empêché d'identifier les inositides.

II. — IDENTIFICATION PAR SUBSTANCES TEMOINS.

En raison de la difficulté d'obtention d'un Rf constant (84) pour les phospholipides, de la spécificité assez large et du défaut de sensibilité de certains réactifs, ces méthodes colorimétriques ne parviennent pas toujours à identifier tous les phospholipides présents dans un extrait. Pour cette raison, elles ne doivent pas être exclusives mais complétées par la migration de substances témoins sur le même chromatogramme.

Une dernière partie de notre travail a donc consisté en l'isolement de groupes de phospholipides par la combinaison

des procédés d'extraction chimique, selon le tableau que nous donnons page 34 et de chromatographie sur colonne d'acide silicique.

C'est dire que nous envisagerons maintenant dans une étude synthétique, pour chaque phospholipide du cerveau, les moyens d'identification, avec les difficultés que chacun offre ; nous avons tenté de les résoudre :

— soit par l'isolement de corps purifiés témoins,

— soit par des modifications techniques de chromatographie.

1) Phosphatidyléthanolamines - Phosphatidylsérines.

Les céphalines aminées migrent dans les fractions chloroforme-méthanol de proportion 15 v — 1 v à 4 v — 1 v. Elles sont colorées par la ninhydrine en raison du groupement aminé terminal de l'éthanolamine et de la sérine.

Cependant, s'il est facile de les identifier ensemble, leur séparation chromatographique reste difficile (Long, Shapiro and Staples (109). En effet :

— l'acide silicique ne sépare pas parfaitement les phospholipides acides et non acides, ceux-ci étant élués par les mêmes mélanges de solvants (Rouser) (153), (154), (155), (156).

— la chromatographie sur couche mince est également incapable de les différencier autrement que par une légère différence des Rf.

Une explication de ces faits est donnée par Marinetti, Erbland et Stooz (121), puis par Rouser (153).

— La migration chromatographique des phosphatidylsérines dépend du métal qui leur est associé.

Celles-ci, sous forme de sel de K (ou de Na), appliquées sur la colonne subissent un échange d'ion : le K^+ est accroché par l'acide silicique dont l'H^+ remplace cet ion. Or, comme le groupement carboxylique de la phosphatidylsérine est peu ou pas dissocié en présence d'acide silicique, celle-ci est éluée comme la phosphatidyléthanolamine par les fractions riches en chloroforme. La migration est également identique sur la plaque d'acide silicique en couche mince.

Cette liaison des phosphatidylsérines à différents métaux explique aussi les différences d'élution : RATHBONE (148), en appliquant sur la colonne d'acide silicique des sels de Ca et de Mg de phosphatidylsérine montre que celle-ci est éluée par des mélanges chloroforme-méthanol 4 v - 1 v. Mais lorsqu'il introduit des phosphatidylsérines liées au K^+ ou au Na^+ sur une colonne d'acide silicique traitée au préalable par HCl N puis par CO_3HNa, remplaçant les H^+ de l'acide silicique par du Na, les phosphatidylsérines sont élués par les mélanges chloroforme-méthanol 3 v - 2 v.

Cela introduit donc deux nouvelles difficultés dans l'identification des phosphatidylsérines et éthanolamines et implique l'importance des témoins.

a) Isolement du témoin purifié.

On obtient les céphalines par extractions successives du précipité acétonique d'un cerveau humain avec éthanol, éther de pétrole, éther. Les céphalines ainsi obtenues sont loin d'être pures. Nous les purifions par passage sur colonne d'acide silicique et élution par

— chloroforme,
— chloroforme-méthanol 7 v - 1 v,
— chloroforme-méthanol 1 v - 1 v.

La fraction 7 v — 1 v contient des céphalines, dans un grand état de pureté. Il s'agit de phosphatidylsérine et éthanolamine et de plasmalogènes de ces deux constituants.

La séparation peut être réalisée selon un procédé décrit par ROUSER et Coll. (153), en utilisant une colonne d'acide sili-

cique-silicate-eau. Les phosphatidyléthanolamines sont éluées de la façon habituelle par les fractions chloroforme-méthanol 12 v — 1 v à 4 v — 1 v. Les phosphatidylsérines sont éluées par le méthanol.

b) Séparation des deux constituants sur plaque d'acide silicique.

Skipski, Petepson et Barclay (160) réalisent deux sortes de plaques de chromatographie : des plaques neutres et des plaques basiques ; ces dernières sont préparées par mélange d'acide silicique (silicagel) avec des solutions 0,01 M de carbonate de sodium.

Nous avons utilisé ce dernier procédé, nous ne le trouvons pas supérieur à la chromatographie sur plaques préparées selon notre méthode habituelle c'est-à-dire neutres.

On doit donc, par ces diverses techniques, parvenir à une bonne identification des phosphatidyléthanolamines et sérines dans les différentes fractions des phospholipides.

2) Inositides.

Leur identification présente certaines difficultés.

Celles-ci proviennent de la faible quantité d'inositol existant sur les spots de chromatographie.

Nous avons pu les identifier de deux façons :

— par hydrolyse alcaline à partir d'un éluat de taches de chromatographie sur papier,

— par isolement d'inositide sur colonne d'acide silicique puis coloration par le réactif de Scherer sur chromatographie en couche mince.

a) Chromatographie sur papier.

Nous avons tout d'abord tenté de réaliser la chromatographie sur papier à la formaldéhyde, procédé décrit par Ho-

RAMMER (81) mais la préparation du papier est très difficile et a été sans doute détectueuse puisque nous n'avons pu obtenir de spots interprétables.

Nous avons ensuite élué sur les chromatogrammes les taches des fractions 4/1 avant le Rf des inositides, par 4 ml de mélange chloroforme-méthanol 4/1 et nous avons pratiqué une hydrolyse alcaline sur cet éluat.

Sur le produit de cette hydrolyse, nous avons fait une réaction de SCHERER par adjonction de 1 cristal d'acétate de Baryum et de quelques gouttes d'NO^3H fumant. Nous avons pu constater l'apparition d'une coloration rouge de Rhodizonate de Baryum.

b) Chromatographie sur plaque.

L'identification des inositides des chromatographies sur plaque ne peut utiliser le procédé précédent en raison de l'impossibilité que l'on éprouve à éluer les taches à partir d'un chromatogramme sur plaque. De plus, la quantité d'inositol étant relativement faible par rapport à la quantité de phosphoaminolipides présents dans la fraction 4 v — 1 v, il était intéressant de débarrasser cette fraction des constituants aminés pour ne conserver que les inositides et ainsi augmenter la prise d'essai sur le chromatogramme.

Nous avons donc tout d'abord préparé un témoin d'inositolphosphatides par fractionnement sur acide silicique selon la méthode décrite par HANAHAN et OLLEY (73).

Ces auteurs montrent que la fraction 4 v-1 v qui élue les inositolphosphatides contient une certaine quantité de composés azotés qui sont des céphalines et des plasmalogènes. Pour débarrasser la phase 4 v-1 v de ces contaminants, il est commode de reprendre après évaporation le résidu de cette fraction par un mélange chloroforme-méthanol de gradient chloroformique un peu plus élevé 11 v-1 v, et de l'appliquer sur une colonne d'acide silicique.

On élue alors successivement par deux fractions d'éluant :

11 v-1 v puis 5 v-2 v.

La fraction 5 v-2 v contient les inositides et permet d'avoir un témoin libre de phosphoaminolipides.

Sur chromatographie en couche mince, nous avons pu identifier cet inositide par la coloration rose saumon donnée par la réaction de FLEURY, COURTOIS et MALANGEAU (57) ce qui nous a servi de repère pour caractériser nos spots d'inositides.

La différenciation entre mono-, di- et tri-inositides est plus difficile à réaliser. Nous verrons cependant que dans certains cas on obtient plusieurs spots dans la zone des inositides de la fraction 4 v-1 v.

3) Plasmalogènes.

Leur identification par le réactif de SCHIFF est satisfaisante. Cependant la différenciation entre les divers plasmalogènes selon la base azotée ne peut être faite que par la position de chaque spot sur la plaque d'acide silicique car chaque plasmalogène suit le dérivé du cycle correspondant. Il n'existe pas de coloration spécifique selon la base azotée.

4) Lécithines.

Dans ce cas également l'identification est facile ; leur élution dans les fractions 3 v-2 v, 5 v-4 v est significative.

Leur coloration par le réactif de DRAGGENDORF n'est pas toujours spécifique sur plaque. C'est pourquoi nous utilisons dans la plupart des cas un témoin préparé à partir de jaune d'œuf. La technique de préparation ne nous intéresse pas ici.

5*) Sphingomyélines.*

Nous avons grâce à leur situation sur le chromatogramme entre lécithines et lysocithines identifié toujours facilement les sphingomyélines. Cependant on peut préparer selon une technique très analogue à celle de la préparation des inositides, des sphingomyélines à peu près pures.

SWEELEY (166) extrait les lipides du plasma par leur précipitation acétonique, traite ce précipité par l'éthanol, puis

chromatographie sur colonne et élue avec deux mélanges chloroforme-méthanol 4 v - 1 v, et 1 v - 3 v. Il recueille dans cette dernière fraction les sphingomyélines souillées par des lécithines. Il poursuit la purification par hydrolyse alcaline puis effectue un nouveau fractionnement sur colonne avec les mêmes éluants que précédemment.

Nous avons pu à plusieurs reprises obtenir au cours de nos fractionnements une phase chloroforme-méthanol 1 v - 1 v contenant des sphingomyélines presque pures. Leur situation entre les lécithines de la phase 5 v - 4 v et les lysocithines de la phase méthanolique permet une identification aisée.

6)*Lysophosphatides.*

Il est indispensable d'utiliser un témoin en raison de la situation terminale des lysophosphatides (élution méthanolique) et de leur situation dans le chromatogramme dans une région voisine de celle des sphingomyélines ; la distinction entre les deux phospholipides étant difficile.

Nous avons utilisé un témoin * préparé à partir de jaune d'œuf, dont les phospholipides sont extraits par l'acétone, puis fractionnés et purifiés sur colonne d'acide silicique.

On part de 1 gr de phospholipides, extraits du jaune d'œuf : ils sont fractionnés sur une colonne de 50 g d'acide silicique, puis élués par 1,500 l. de chloroforme méthanol 1 v-1 v, et par 1,500 l de méthanol. Ce dernier éluat contient les lysocithines pures.

Après avoir choisi parmi ces différentes techniques celles qui nous paraissaient les meilleures nous les avons appliquées à l'étude des phospholipides de cerveaux animaux et humains suivant le plan que nous nous étions tracé.

Les résultats vont être exposés dans les pages suivantes.

* Témoin préparé dans le laboratoire par le docteur LLOVERAS que nous remercions bien vivement.

CHAPITRE II

Résultats

Nos premières recherches se sont d'abord adressées à des cerveaux d'animaux de boucherie faciles à obtenir et à des cerveaux humains, suivant un choix dont nous préciserons les modalités.

I. - Fractionnement de cerveaux de bœuf

— Nous avons fractionné l'extrait de cerveau total de bœuf sur colonne d'acide silicique.

Les lipides sont isolés de 100 g de cerveau de bœuf sans distinction de substance grise ou de substance blanche.

Cet extrait contient 920 mg de lipides pour 100 g de matière fraîche, soit 9,20 g pour 1 kg. Chiffres en rapport avec les taux habituels.

L'extrait est purifié par le procédé de FOLCH et la phase chloroformique séparée du fluff par congélation.

A. — Dosage du phosphore lipidique.

Le dosage du phosphore lipidique dans l'extrait total et dans l'ensemble des différentes fractions donne les résultats suivants :

— 2280 µg de phosphore pour 60 mg de lipides (en solution chloroformique) sont déposés sur la colonne.

— 2050 µg de phosphore sont retrouvés dans l'ensemble des fractions éluées soit 93 %.

Les pourcentages de phosphore retrouvés dans chaque fraction sont schématisés dans la Figure 1.

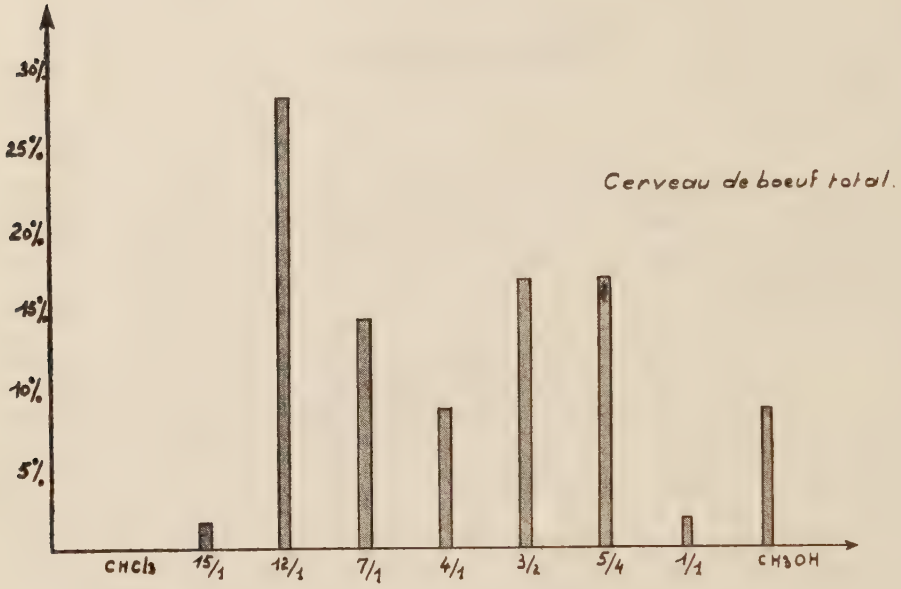


FIG. 1. — *Pourcentage de phosphore lipidique. Cerveau total de bœuf.*

B. — **Chromatographie sur papier.**

La chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique est reproduite Figure 2.

— La fraction 15 v - 1 v ne contient qu'un faible pourcentage de phosphore, constitué essentiellement par des céphalines azotées : 1 spot de Rf 0,50 est révélé par la Rhodamine 6 G en lumière U.V. ; coloré par le réactif à la ninhydrine, il s'agit de phosphatidyléthanolamines.

— Les fractions 12 v - 1 v et 7 v - 1 v contiennent respectivement 28 % et 14 % de phosphore lipidique. Sur la chromatographie chacune contient 2 spots de Rf 0,55 et 0,48, tous deux colorables par la Rhodamine et la ninhydrine.

  — le spot supérieur correspond aux phosphatidyléthanolamines,

  — le spot inférieur correspond aux phosphatidylsérines.

— La fraction 4 v - 1 v contient 8 % de phosphore lipidique.

Sur sa chromatographie on note :

  — Un spot dont le Rf est celui des phosphatidylsérines et qui d'ailleurs est coloré par la ninhydrine ;

  — Une tache de Rf faible 0,32, qui est décelée grâce à la Rhodamine 6 G mais qui n'est colorée :

    — ni par la ninhydrine,
    — ni par le Réactif de SCHIFF,
    — ni par le Réactif de DRAGGENDORF,

  mais qui l'est légèrement par le réactif de HANES-ISHERWOOD.

Nous verrons dans la suite de notre travail que nous avons pu l'identifier comme un inositolphosphatide.

FIG. 2. — *Cerveau de bœuf total.*

Chromatographie sur papier.
Coloration à la Rhodamine 6 G.

— Les fractions 3 v - 2 v et 5 v - 4 v contiennent chacune 17 % de phosphore.

La fraction 3 v - 2 v présente une tache unique de Rf = 0,37, colorée par le réactif de DRAGGENDORFF. Il s'agit de phosphatidylcholine.

La fraction 5 v - 4 v présente 2 taches, l'une semblable à la précédente et une inférieure, colorée par la Rhodamine et le réactif de HANES-ISHERWOOD. Ce sont les sphingomyélines.

— La fraction 1 v - 1 v est pauvre en phosphore et sur la chromatographie, ne montre qu'une faible tache identique à la tache inférieure précédente : leur aptitude à la coloration est la même.

— La fraction méthanolique contient 7,5 % de phosphore.

Sur le chromatogramme, elle montre une tache colorée par la Rhodamine et le Réactif de HANES-ISHERWOOD. Son Rf est identique à celui de la tache précédente : il s'agit du même constituant.

En résumé :

Le fractionnement de cerveau de bœuf montre deux groupes de phospholipides situés de part et d'autre de l'éluant 4 v-1 v et caractérisés par deux pics de phosphore lipidique. Si nous groupons ces teneurs selont les gradients d'élution, nous obtenons :

— pour les fractions 15/1, 12/1, 7/1, 4/1 un total de 52 % de phosphore lipidique ;

— et pour 3/2, 5/4, 1/1 une somme de 38 % de phosphore lipidique.

Il n'y a pas de lysocithine dans la fraction méthanolique malgré le chiffre élevé de phosphore lipidique.

II. - Fractionnement des phospholipides de cerveaux humains normaux

Nous avons fractionné les phospholipides de cerveaux provenant de trois adultes indemnes d'affection neurologique.

— Cerveau A : d'une femme âgée de 65 ans décédée par occlusion intestinale.

— Cerveau B : d'un homme de 68 ans décédé à la suite d'un infarctus du myocarde.

— Cerveau C : d'un homme âgé de 47 ans, polytraumatisé.

A. - Préparation des extraits

1) La dissection nous a permis de séparer :

— pour le premier : substance grise et substance blanche,

— pour les deux derniers : substance grise,
substance blanche,
noyaux gris centraux,
corps calleux.

2) L'extraction a été réalisée selon le procédé habituel par le couple de solvants chloroforme-méthanol.

A la fin de l'extraction nous avons pu obtenir pour les trois cerveaux :

— une moyenne de 175 à 178 g de lipides pour 1 kg de substance blanche fraîche,

— une moyenne de 70 à 72 g de lipides pour 1 kg de substance grise.

Ces résultats s'accordent bien avec les valeurs précédemment citées (5), (7), (22) :

— 183 g/1.000 de lipides dans la substance blanche,

— 65 g/1.000 de lipides dans la substance grise,

3) L'extrait est ensuite purifié selon le procédé de Folch.

B. - Substance blanche

1) Chromatographie sur colonne.

L'extrait lipidique est alors soumis à la chromatographie sur colonne selon la technique indiquée précédemment.

a) Prise d'essai :

Elle est dans chaque cas constituée par la solution chloroformique purifiée selon FOLCH.

— Cerveau A :

2 ml de chloroforme contenant 60 mg de lipides et 1.200 µg de phosphore lipidique.

— Cerveau B :

5 ml de chloroforme contenant 121 mg de lipides et 2.475 µg de phosphore lipidique.

— Cerveau C :

3 ml de chloroforme contenant 105 mg de lipides et 1.800 µg de phosphore lipidique.

Nous avons obtenu les résultats suivants pour chacune des fractions éluées.

b) Teneurs en phosphore lipidique :

Lorsque nous considérons les résultats des dosages du phosphore lipidique des différentes fractions éluées, nous sommes frappés par la discordance qui semble exister pour des régions identiques de cerveaux différents. Mais ces résultats doivent être interprétés à la lumière des chromatogrammes et selon les fractionnements réalisés par POLONOVSKI (141), à partir des lipides du sérum, on peut établir un schéma d'élution de référence.

— Dans le chloroforme s'élimine tout ce qui n'est pas phospholipides : graisses neutres. stérides et cérébrosides ;

— 15/1 élue les acides phosphatidiques et les phosphatidyléthanolamines ;

— 12/1 entraîne les phosphatidyléthanolamines restantes, les phosphatidylsérines, les premiers plasmalogènes à éthanolamine et sérine ;

— 7/1 contient les phosphatidylsérines, les plasmalogènes, le début des inositides.

— 4/1 élue la fin des plasmalogènes, les inositides dans leur totalité.

— 3/2 entraîne les lécithines et leurs plasmalogènes.

— 5/4 contient les lécithines et le début des sphingomyélines,

— Le méthanol pur élue sphingomyélines et lysocithines éventuelles.

Dès lors on conçoit que dans l'interprétation des résultats, il soit nécessaire de considérer que le taux de phosphore lipidique des fractions 15/1, 12/1, 7/1, 4/1 réunies correspond aux céphalines selon la définition de Folch, c'est-à-dire :

— Phosphatidyléthanolamines,

— Phosphatidylsérines,

— Plasmalogènes à éthanolamine,

— Plasmalogènes à sérine,

— Inositolphosphatides.

— De même les fractions 3/2, 5/4, 1/1 sont groupées en raison de leur gradient d'élution voisin, elles éluent les lecithines et les sphingomyélines.

— La fraction méthanolique enfin entraîne les sphingomyélines restantes et les lysocithines.

Les variations de la concentration phospholipidique de l'éluat sont très importantes au sein d'un même groupe ; de même les limites entre lesquelles varient les teneurs des différents phospholipides du cerveau sont souvent de l'ordre de 10 à 15 % selon les auteurs.

Cela semble dû à notre avis aux différences d'origine des cerveaux étudiés.

Il est en effet bien difficile de donner des pourcentages normaux car on ne peut établir des critères de normalité de façon précise après la mort.

Nous parlons dans notre travail de valeurs retrouvées à partir de cerveaux normaux. Or ceux-ci appartiennent à des malades qui sont morts d'affections différentes, qui ont plus ou moins jeûné de par leur maladie, qui n'ont pas eu la même alimentation et le même traitement, qui enfin n'avaient pas le même âge.

D'autre part, selon la maladie cause de la mort, certains ont eu des perturbations métaboliques particulières, ont reçu divers traitements tels que des perfusions qui peuvent avoir modifié leurs constituants cérébraux.

D'où notre tendance à considérer avec précaution les différences dans les teneurs en phosphore lipidique de nos cerveaux et à ne parler que de cerveaux « présumés » sains ou tout au moins appartenant à des sujets exempts d'affection hépatique, puisque nous avons étudié par ailleurs un autre groupe de sujets décédés de coma hépatique avec hyperammoniémie. Ces derniers ayant même maladie, ayant eu même traitement, nous ont donné des pourcentages plus constants et des proportions plus concordantes. Sur nos trois cerveaux présumés

sains, un seul, celui provenant d'un polytraumatisé, paraît le moins éloigné de l'état physiologique, bien que la mort n'ait pas été immédiate.

Pour toutes ces raisons, nous ne considérons sur le plan quantitatif que les chiffres correspondant à des groupes de fractions, et plus particulièrement à celui des céphalines, bien définies de 15/1 à 4/1 sur le chromatogramme :

— 4/1 constitue une sorte de barrière au milieu du fractionnement, formant la séparation entre ce qui est céphalines d'une part, et ce qui est lécithines et sphingomyélines d'autre part.

A la lumière de ces considérations, certes un peu longues, mais nécessaires à l'interprétation des résultats, nous pouvons constater que sur ces trois fractionnements de substance blanche le phosphore lipidique retrouvé est pour les fractions de 15/1 à 4/1 de l'ordre de : (Tableau n° II).

— 58 % pour le cerveau A,
— 60 % pour le cerveau B,
— 49 % pour le cerveau C.

— Pour les fractions 3/2, 5/4, 1/1 de l'ordre de :

— 39 % pour le cerveau A,
— 36 % pour le cerveau B,
— 44 % pour le cerveau C.

Fractions	Teneur en Phosphore lipidique des fractions					
	A		B		C	
	µg.	%	µg.	%	µg.	%
$CHCl_3$	0	0	0	0		
15/1	110	11	0	0	36	2
12/1	253	24	441	20	240	14
7/1	219	20	760	34	368	21
4/1	30	3	137	6	220	12
Total...		58		60		49
3/2	220	20	204	9	475	29
5/4	134	13	400	18	231	13
1/1	65	6	200	9	50	3
Total...		39		36		45
MeOH	28	3	80	3	75	5
Total ..	1059		2222		1695	

Tableau n° II.

Dosage du phosphore lipidique. --
Substance blanche cerveaux normaux.

Pour les cerveaux :

A. — 1059 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 1200 mis sur colonne, soit 90 %.

B. — 2222 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2475 mis sur colonne, soit 90 %.

C. — 1695 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 1200 mis sur colonne, soit 94 %.

Ces chiffres nous serviront de base dans la comparaison avec les cerveaux de coma hépatique.

Nous avons étudié chaque fraction par des chromatographies sur papier imprégné d'acide silicique pour le cerveau A, et par des chromatographies en couche mince pour les cerveaux B et C.

2) Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique.

Nous déposons une quantité de 3 à 4 μg de phosphore par prise d'essai et colorons par la Rhodamine 6 G, (Figure 3).

FIG. 3. — *Cerveau humain normal. -- Substance blanche.*

Chromatographie sur papier.
Coloration : Rhodamine 6 G.

— La piste 15/1 comporte une seule tache qui correspond aux céphalines. En effet :

— elle est colorée par la ninhydrine,

— son Rf de 0,58 est celui des céphalines.

— La fraction 12/1 présente deux taches identiquement colorées par la rhodamine et la ninhydrine. La tache supérieure (e f) correspond aux céphalines à éthanolamine et sérine. Pour la tache (d) nous avions pensé qu'il s'agissait de phosphatidylsérine ; la suite de notre expérimentation nous a prouvé qu'il fallait voir là plutôt des plasmalogènes.

— Sur la piste 7/1 se voient trois taches (e f), (d) et (a) (e f) et (d) sont identiques à celles de la piste précédente. Le troisième spot (a) a un Rf = 0,34 ce qui pourrait faire penser à des lysocithines. Ce spot est bien visible sur la piste suivante.

— Sur la fraction 4/1 on retrouve en effet une tache (a) révélée par la Rhodamine 6 G dont l'identification s'est avérée difficile.

Nous avons essayé les différentes réactions suivantes :

La Ninhydrine ne nous a donné aucune coloration. Nous avons alors pratiqué une hydrolyse acide de la fraction 4/1 et fait une nouvelle chromatographie de l'hydrolysat sans plus de succès. Ces deux échecs permettent de conclure a l'absence d'un groupement NH_2 libre ou lié.

Le réactif de DRAGGENDORFF n'a pas coloré cette tache montrant l'absence de choline, et permettant donc d'éliminer des lécithines ou lysocithines.

Le réactif d'HANES ISHERWOOD colore très discrètement ce spot. La coloration bleu pâle n'est apparue qu'après 12 heures, de tonalité bien inférieure à celle des autres spots de phospholipides. Cette coloration traduisait la présence de phosphore.

Quant au réactif de SCHERER, modifié par COURTOIS, FLEURY et MALANGEAU, il ne donnait aucune coloration, semblant exclure la présence d'inositol.

Cependant :

— l'élution habituelle des inositides dans la fraction 4/1 -

— leur faible migration, analogue à celle des lysocithines en chromatographie sur papier. nous ont incité à mieux rechercher dans ce spot les inositides.

Nous avons pu les identifier par élution des taches de chromatographie et hydrolyse alcaline de l'éluat avec coloration par le réactif de SCHERER et GALLOIS. La réaction ayant été pratiquée sur tube à essai a été positive. Nous croyons donc pouvoir affirmer qu'il s'agit d'un inositide.

— La piste correspondant à la fraction 3/2 montre l'existence d'une tache unique, colorée par le réactif de DRAGGENDORFF ; il s'agit de phosphatidylcholines de Rf 0,47.

— Les fractions correspondant à 5/4 et 1/1 sont superposables ; elles montrent deux taches, lécithines pour la tache supérieure (c) et sphingomyélines (b) pour la tache inférieure, ces dernières identifiées grâce à leur coloration par la Rhodamine 6 G et leur Rf : 0,39.

— La dernière piste correspondant à la fraction méthanolique présente deux spots qui ont les Rf des spots précédents. Il s'agit de lécithines et sphingomyélines. Mais, fait capital, il n'y a pas de lysocithines : leur lieu de migration se situerait, en effet, au-dessous des sphingomyélines, Rf 0,30.

Nous notons donc la richesse de la substance blanche en inositides et en sphingomyélines, retrouvées dans trois fractions successives et surtout l'absence de lysocithines dans la fraction méthanolique. .

Sur la première piste qui correspond à la chromatographie de l'extrait total avant le fractionnement, on retrouve les différents constituants, mais Phosphatidyléthanolamines et sérines sont séparées (e) et (f) en raison probablement de l'utilisation

de chloroforme seul au lieu de 15/1 comme solvant de la prise d'essai. Quant à la tache (a) qui a le Rf des lysocithines (0,32), la suite du fractionnement nous a montré qu'il s'agissait de Phosphoinositides.

3) Chromatographie en couche mince.

Sur le chromatogramme de la Figure 4, nous voyons que les résultats obtenus sont sensiblement différents de ceux de la chromatographie sur papier.

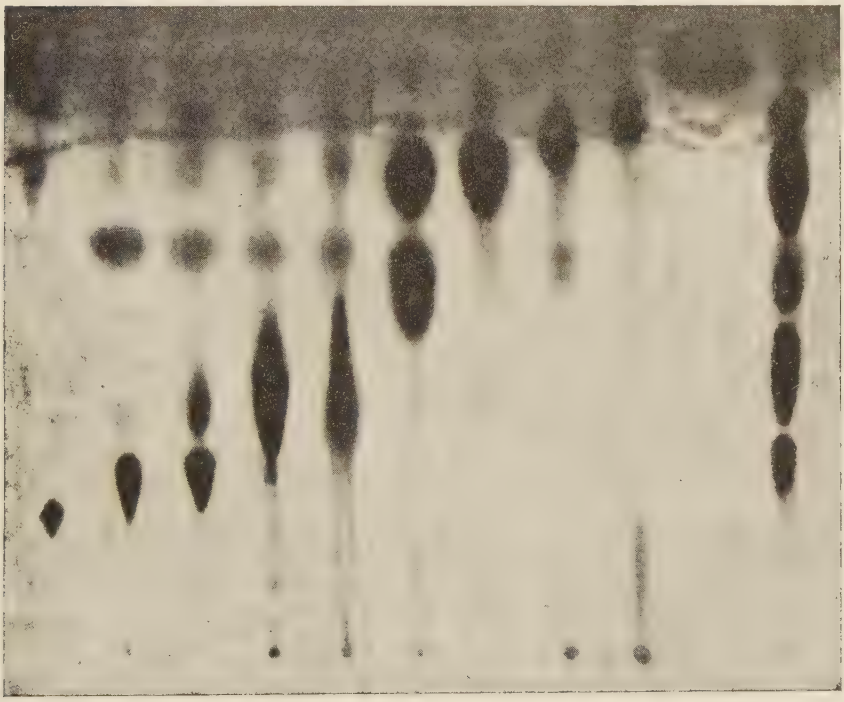


FIG. 4. — ***Cerveau normal. — Substance blanche.***

Chromatographie sur plaque.
Coloration à l'acide phosphomolybdique.

La piste chloroformique confirme l'absence de phospholipides et montre la grosse tache de graisses neutres qui se confond avec le front.

La fraction 15/1 permet de noter la bonne séparation entre phosphatidyléthanolamine (g) et phosphatidylsérine (f) : deux taches qui sont colorées par la ninhydrine. Le témoin de phosphatidylsérine, préparé selon la méthode préconisée par RATHBONE nous a permis d'identifier les phosphatidylsérines dans la tache inférieure (148).

La piste 12/1 montre deux taches mal séparées ; la tache supérieure correspond aux phosphatidylsérines par analogie avec la piste précédente.

Quant à la tache inférieure (e), si elle est colorée par la ninhydrine, elle prend également la coloration de SCHIFF et peut être identifiée à des plasmalogènes à éthanolamine et sérine.

Cette double coloration laisse présumer la juxtaposition des phosphatidylsérines et des plasmalogènes qui va se préciser sur les pistes suivantes 7/1 et 4/1.

La piste 4/1 présente, en effet, trois taches : (f) et (e) correspondent aux phosphatidylsérines et plasmalogènes ; la tache inférieure (d) nous a posé certains problèmes d'identification.

Sa position dans la fraction 4/1 nous fait penser qu'il s'agit d'inositides. Cependant cette tache n'est pas colorée par le réactif de COURTOIS, FLEURY et MALANGEAU : probablement parce que sa richesse en inositol est trop faible et il est difficile d'augmenter la prise d'essai car les plasmalogènes seraient alors trop importants sur la piste.

Nous avons pu l'identifier en utilisant un témoin de Monophosphoinositide : celui-ci a été préparé à partir d'une fraction 4/1 selon la technique précisée page 55 (HANAHAN et OLLEY) (73). Ces taches sont colorées par le Réactif de SCHERER

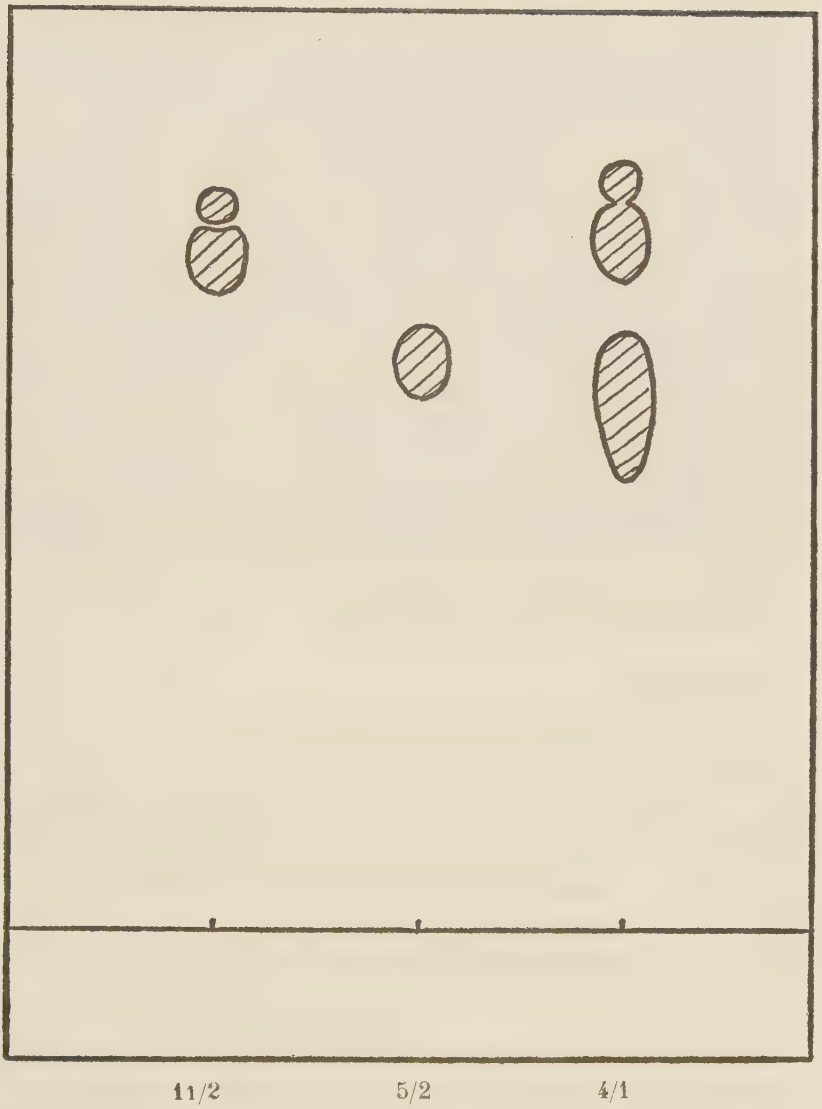


FIG. 4 bis. — *Détection chromatographique d'inositides.*

11/2 Coloration par acide phosphomolybdique : céphalines azotées.
5/2 Coloration par le réactif de SCHERER : inositide.
4/1 Coloration par acide phosphomolybdique.

modifié et par analogie avec le témoin, les monophosphoinositides occupent la partie supérieure du spot (d) ; la partie inférieure étant sans doute occupée par les inositides polyphosphorés. (Figure 4 bis).

Dans les pistes 3/2 et 5/4 on retrouve une tache importante (c) (d) qui correspond aux lécithines comme nous l'a montré la migration parallèle de lécithines d'œuf témoin. Cependant, cette tache prend très légèrement à son sommet (d) la coloration de SCHIFF, ce qui pourrait indiquer la présence de quelques plasmalogènes à choline parmi ces lécithines.

Dans la piste 1/1, la tache de lécithine s'estompe et la tache inférieure est celle des sphingomyélines.

Enfin, la piste correspondant à la fraction méthanolique ne contient qu'une tache : celle des sphingomyélines. Cependant, ce spot descend aussi bas que le témoin de lysocithine voisin et nous pouvons penser que lysocithines et sphingomyélines ne sont pas séparées.

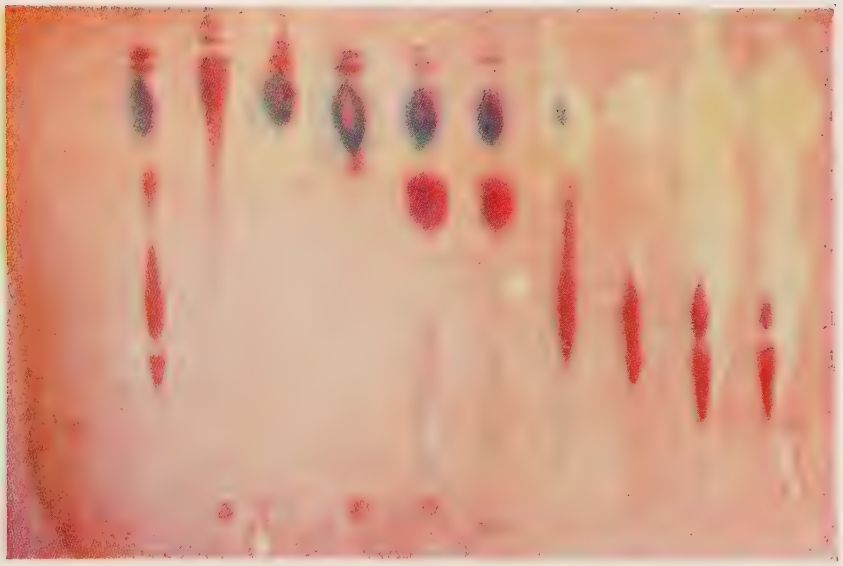
En résumé :

— Sur ces chromatogrammes en couche mince, le fractionnement apparaît meilleur que sur papier.

— La séparation des céphalines est plus nette ; il a surtout été possible d'individualiser et d'identifier les plasmalogènes par le réactif de SCHIFF. (Voir Figure en couleur).

— La position des inositides est différente de celle qu'ils ont sur papier.

— On peut aussi se rendre compte que chaque éluant, aussi abondant soit-il, n'est pas absolument sélectif : malgré de grosses quantités de chloroforme-méthanol 1 v - 1 v, nous n'avons jamais pu entraîner complètement les sphingomyélines (ceci en matière de cerveau). On en retrouve toujours dans la phase méthanolique, sauf si nous complétons les fractions d'éluants par les mélanges intermédiaires chloroforme-méthanol 1 v - 2 v, 1 v - 3 v.



Chromatographie de substance blanche, cerveau normal.

Coloration par le réactif de Schiff.

On distingue trés nettement les plasmalogènes (e) colorés en bleu-violacé par rapport aux autres phospholipides qui apparaissent roses sur le cliché.

C. - Corps calleux

Le corps calleux prélevé dans son ensemble à partir des cerveaux B et C a subi une extraction lipidique et une purification selon la technique habituelle.

1) Chromatographie sur colonne.

a) Prises d'essai :

Cerveau B

— 3 ml de chloroforme contiennent 135 mg de lipides et 2.850 μg de phosphore lipidique.

Cerveau C

— 6 ml de chloroforme contiennent 216 mg de lipides et 4.680 μg de phosphore lipidique.

Le fractionnement sur colonne nous a donné les résultats suivants :

b) Teneur en phosphore lipidique :

Les quatre fractions de 15/1 à 4/1 donnent les pourcentages suivants : (Voir tableau n° III)

— pour le cerveau B : 47 %
C : 51,9 %

Les fractions correspondant à 3/2, 5/4 et 1/1 contiennent :

— pour le cerveau B : 48 %
C : 45 %

Les teneurs en phosphore des différentes fractions de corps calleux sont légèrement différentes de celles de substance blanche. On note une diminution du phosphore lipidique des fractions céphaliniques de l'ordre de 10 %.

Fractions	Teneurs en P lipidique des fractions			
	B		C	
	µg.	%	µg.	%
$CHCl_3$	0	0	0	0
15/1	189	7	435	10.5
12/1	726	27	1039	25,4
7/1	145	5	465	11
4/1	219	8	205	5
Total		47		51,9
3/2	570	21	786	19,3
5/4	540	20	743	18,4
1/1	180	7	296	7,3
Total		48		45
MeOH	99	5	135	3
Total	2668		4104	

Tableau n° III.

Teneur en phosphore lipidique des différentes fractions de corps calleux normaux.

Pour les cerveaux :

B. — 2668 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2850 mis sur colonne, soit 90 %.

C. — 4104 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 4480 mis sur colonne, soit 92 %.

2) Chromatographie en couche mince.

La fraction chloroformique ne contient pas de phosphore lipidique et n'est pas colorée par la ninhydrine ; le spot important qu'elle présente est constitué par les graisses neutres et les stérides. (Figure 5).

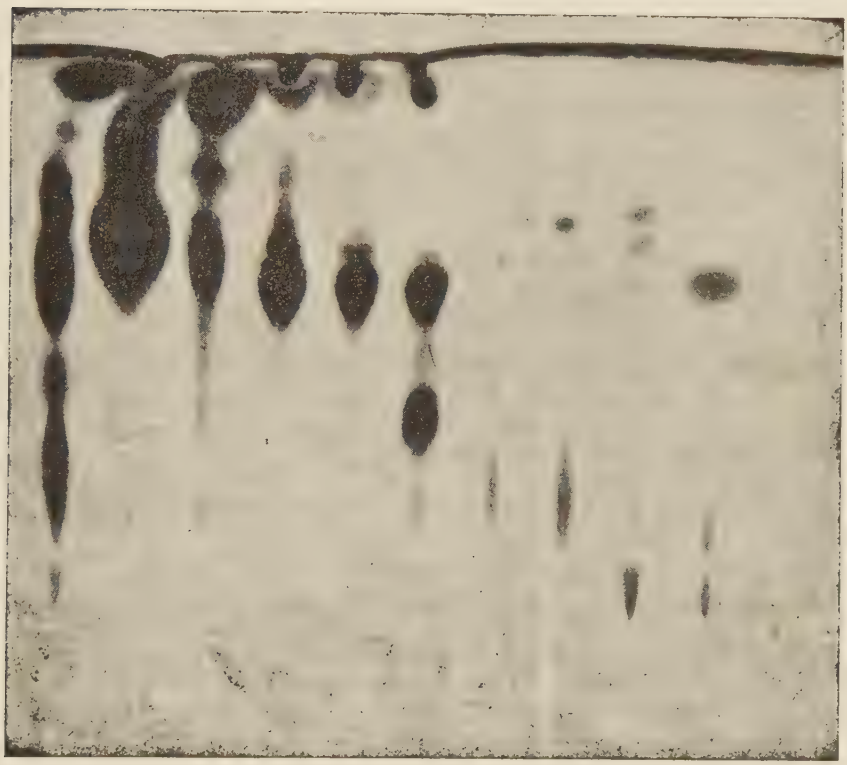


FIG. 5. — *Fractionnement de corps calleux.*

Cerveau normal.
Coloration à l'acide phosphomolybdique.

— les fractions 15/1, 12/1, 7/1 montrent :

— en (h) les acides phosphatidiques,

— en (g) les phosphatidyléthanolamines,

— en (f) les phosphatidylsérines,

— en (e) les plasmalogènes.

— la fraction 4/1 présente 2 taches de :

— plasmalogènes en (e),

— inositides en (d).

— les fractions 3/2 et 5/4 mettent en évidence les lécithines en (c).

— les fractions 5/ 4 et 1/1 présentent en (g) et (f) une tache que nous avons identifiée (coloration par la ninhydrine) à une phosphatidylsérine ayant conservé son cation monovalent.

— la fraction MeOH s'individualise par le petit spot de lysocithine, retrouvé sous les sphingomyélines, identifié par le témoin de lysocithine voisin.

En résumé :

Ce fractionnement est remarquable :

— par la présence en 5/4 et 1/1 d'une tache qui selon MARINETTI et RATHBONE serait une phosphatidylsérine ayant conservé un cation monovolent (73).

— par l'existence d'un petit spot de lysocithine dans la fraction méthanolique.

D. - Substance grise

1) Chromatographie sur colonne.

a) Prises d'essai :

Cerveau A :

— 2 ml de chloroforme contiennent 112 mg de lipides et 1500 µg de phosphore lipidique.

Cerveau B :

— 5 ml de chloroforme contiennent 126 mg de lipides et 1396 µg de phospohre lipidique.

Cerveau C :

— 4 ml de chloroforme contiennent 202 mg de lipides et 4650 µg de phosphore lipidique.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

b) Teneur en phosphore lipidique.

La somme de phosphore lipidique contenu dans les quatre tractions de 15/1 à 4/1 et correspondant aux céphalines nous donne les chiffres suivants : (Tableau n° IV).

— Cerveau A : 49 %.
— Cerveau B : 52 %.
— Cerveau C : 43 %.

De même les teneurs des trois fractions 3/2, 5/4, 1/1 qui ont un gradient assez voisin sont pour les trois cerveaux :

— Cerveau A : 49 %.
— Cerveau B : 38,5 %.
— Cerveau C : 53 %.

Fractions	Teneur en P lipidique des fractions					
	A		B		C	
	µg.	%	µg.	%	µg.	%
CHCl3	0	0	0	0	0	0
15/1	111	7,5	22	1	98	2
12/1	143	9	72	6	198	4,5
7/1	420	29	325	25	1200	26
4/1	52	3,5	272	20	475	10,5
Total...		49		52		43
3/2	462	31,5	100	8	563	12
5/4	188	13	189	15,5	1040	23
1/1	64	4,5	195	15	810	18
Total...		49		38,5		53
MeOH	30	2	105	8	180	4
Total...	1470		1280		4564	

Tableau n° IV.

Dosage du phosphore lipidique. --
Substance grise de cerveaux normaux.

Pour les cerveaux :

A. — 1470 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 1500 mis sur colonne,

B. — 1280 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 1396 mis sur colonne,

C. — 4584 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 4650 mis sur colonne.

La comparaison de ces taux avec ceux obtenus pour la substance blanche permet de noter certaines analogies :

— il n'y a pas de phosphore dans la première fraction de chloroforme pur.

— il existe deux parties de phosphore de part et d'autre de la fraction 4/1 correspondant avant celle-ci aux céphalines et après elle aux lécithines et sphyngomyélines.

— pour le Cerveau B le minimum se situe au niveau de 3/2 et non de 4/1 mais toutefois sur le chromatogramme l'élution des céphalines est terminée à 3/2. Tout se passe comme s'il y avait un retard de migration des différents phospholipides. 4/1 étant beaucoup plus riche en céphalines qu'il ne l'est habituellement. Cela peut être dû dans ce cerveau B à une plus importante quantité de céphalines.

Il faut noter enfin la discordance du chiffre de phosphore lipidique des fractions 3/2, 5/4, 1/1 qui est bas, cela parce que l'élution des lécithines s'est poursuivie dans le MeOH.

Les fractions provenant du cerveau A ont été chromatographiées sur papier imprégné d'acide silicique.

Celles correspondant aux cerveaux B et C ont été chromatographiées en couche mince.

FIG. 6. — *Fractionnement sur papier de substance grise.*

Cerveau normal.

Coloration à la Rhodamine vue en lumière U. V.

2) Chromatographie sur papier.

La fraction 15/1 présente deux taches colorées par la Rhodamine et la ninhydrine. (Figure 6). Il s'agit des phosphatidyléthanolamines et sérines. Cependant.

— la piste 12/1 montre deux taches se colorant également par la ninhydrine et la rhodamine mais la tache inférieure ne correspond pas aux phosphatidylsérines. Nous pensons, nous le montrerons plus loin, que les phosphatidylsérines et éthanolamines, non séparées, sont situées dans la tache supérieure, la tache inférieure étant formée de plasmalogènes, par assimilation à la chromatographie en couche mince.

— en 7/1 nous constatons une tache inférieure qui marque le début de la migration des inositides (Rf 0,32).

— la piste 4/1 est presque débarrassée des céphalines et ne comporte qu'une tache d'inositides (a).

— 3/2. 5/4, 1/1 mettent bien en évidence la séparation progressive des phosphatidylcholines et des sphingomyélines, cette séparation devenant complète dans la fraction 1/1.

— la fraction méthanolique comprend trois taches de Rf 0,34, 0,32, 0,30. Les Rf de 0,34 et 0,32 correspondent aux lécithines et sphingomyélines : il est évident que le spot inférieur 0,30 est une tache de lysocithine.

Nous avons, en raison de l'importance qu'avait cette présence de lysocithine dans la substance grise, chromatographié sur papier la fraction méthanolique de quatre extraits de substance grise de deux cerveaux différents, ayant été soumis ou non au procédé de FOLCH.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

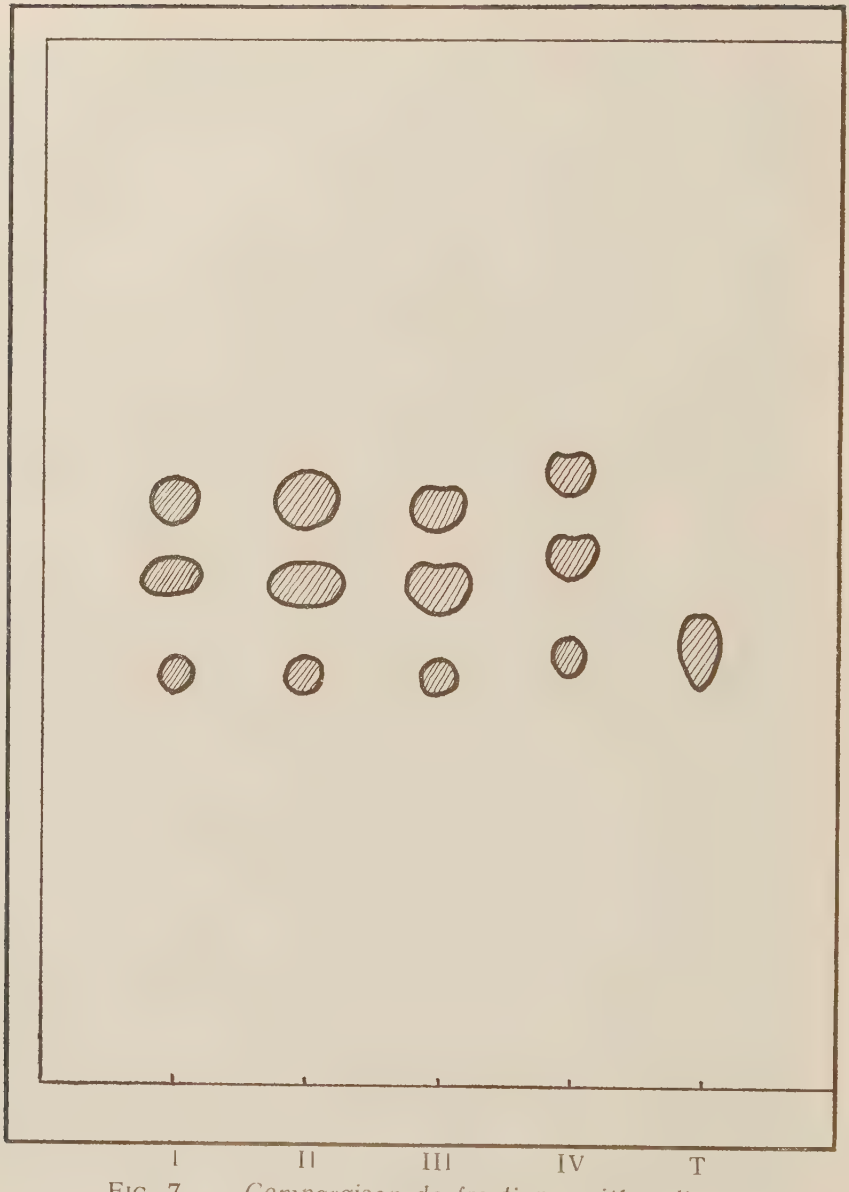


FIG. 7. — *Comparaison de fractions méthanoliques de substance grise. -- Cerveaux normaux. Chromatographie sur papier. -- Coloration : Rhodamine 6 G.*

I. S. G. n° 1 sans FOLCH.
II. S. G. n° 1 après FOLCH.
III. S. G. n° 2 sans FOGCH.
IV. S. G. n° 2 après FOLCH.
T : Témoin de lysocithine

— D'une part il y a une tache de lysocithines dans chacune des quatre pistes ; elle est identifiée par une lysocithine d'œuf témoin ; ceci prouvant la présence de lysocithines dans les extraits de substance grise de cerveau. (Figure 7).

— D'autre part, la prise d'essai étant de 60 mm^3 contenant 3 μg de phosphore et bien sûr à partir de la même quantité de substance fraiche, on peut constater que les autres fractions avant et après FOLCH sont également riches en lysocithines ; ce qui permet d'affirmer que ce procédé n'élimine pas les phospholipides hydrosolubles.

2) Chromatographie en couche mince.

Nous reproduisons la chromatographie du cerveau C (substance grise). (Figure 8).

— la piste 15/1 se singularise par la présence de deux spots (h) et (g) révélés par l'acide phosphomolibdique. Seule la tache inférieure est colorable par la ninhydrine et est une phosphatidyléthanolamine.

— la tache supérieure correspond au lieu de migration des acides phosphatidiques (SKIPSKI, PETERSON et BARCLAY) (160).

— la fraction 12/1 montre les mêmes quatre taches superposées déjà trouvées dans la substance blanche. De bas en haut : plasmalogènes, phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamines et acides phosphatidiques.

— en 7/1 la tache inférieure appartient aux plasmalogènes surmontés par les phosphatidylsérines.

— la piste 4/1 présente le même spot de plasmalogènes mais nous constatons l'existence de deux taches d'inositides, dont la supérieure correspond, nous l'avons vu aux monophos-

phoinositides, le spot sous jacent est un inositol polyphosphorylé.

— en 3/2, 5/4, 1/1 nous retrouvons les lécithines et les plasmalogènes à choline identifiés par la migration d'un témoin.

— dans la phase méthanolique, le spot des lécithines s'estompe et les sphingomyélines sont très apparentes se terminant par une tache de lysocithine comme le confirme le témoin placé à droite de cette piste.

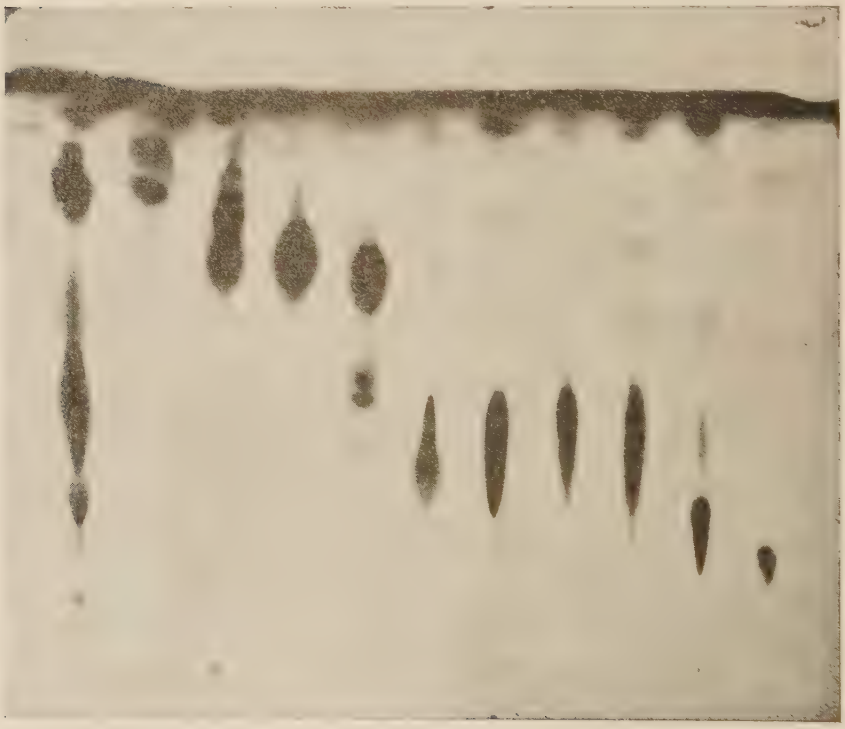


FIG. 8. — *Chromatoplaque substance grise Cerveau normal.*

Coloration à l'acide phosphomolybdique.
T. léc : lécithine Témoin. T. lyso : lysocithine Témoin.

D'ailleurs sur la chromatographie d'extrait total nous retrouvons sous les sphingomyélines (b) une tache bien visible (a) correspondant aux lysocithines et confirmant leur présence dans la substance grise normale.

En résumé :

De ce fractionnement de substance grise normale nous retiendrons :

— la présence d'acides phosphatidiques dans les fractions 15/1 et 12/1.

— la dualité du spot d'inositides, traduisant la présence d'inositides mono- et polyphosphorés.

— l'existence de lysocithines visibles sous les sphingomyélines sur la piste de l'extrait total.

E. - Noyaux gris centraux

Ces noyaux gris centraux ont été prélevés à partir des cerveaux B et C.

1) Chromatographie sur colonne.

a) Prise d'essai :

— Cerveau B :

5 ml de chloroforme contenant 168 mg de lipides et 2520 µg de phosphore lipidique.

— Cerveau C :

3 ml de chloroforme contenant 240 mg de lipides et 5600 µg de phospore lipidique.

Fractions	Teneurs en P lipidique des fractions			
	B		C	
	µg.	%	µg.	%
$CHCl^3$	0	0	0	0
15/1	45	1	110	2
12/1	588	20	942	18
7/1	612	18	800	15
4/1	96	3	400	7,5
Total		42		42,5
3/2	944	30	1140	21
5/4	616	20	1200	22
1/1	159	5	527	10
Total		55		53
MeOH	198	3	240	4
Total	3258		5359	

Tableau n° V.

Noyaux gris centraux. -- Dosage du phosphore lipidique.

Pour les cerveaux :

— B : 3.258 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 3320 mis sur colonne.

— C : 5359 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 5500 mis sur colonne.

b) Teneur en phosphore lipidique.

Le taux des céphalines est ici de l'ordre de : (Tableau n° V).

— 42 % pour le cerveau B,
— 42,5 % pour le cerveau C.

Quant aux fractions 3/2. 5/4, 1/1, elles donnent ensemble les pourcentages suivants :

B = 55 %.
C = 53 %.

Nous n'insisterons pas ici sur ces teneurs en phosphore lipidique que nous retrouverons plus loin, mais nous remarquerons seulement une diminution du phosphore dans la fraction 4/1.

2) Chromatographie en couche mince.

Cette chromatographie ascendante est réalisée sur plaque imprégnée de silicagel, selon la technique habituelle. (Figure 9).

— la fraction chloroformique présente deux taches importantes colorées par l'acide phosphomolybdique.

— la tache supérieure est constituée par des graisses neutres, éluées par le $CHCl_3$. La tache inférieure ne prend pas de coloration par la ninhydrine. La migration dans la

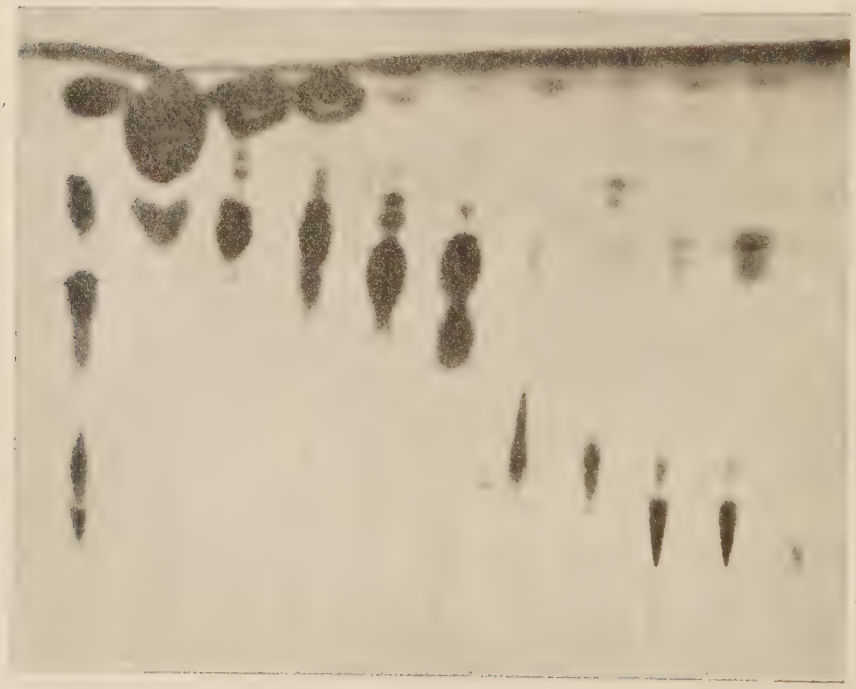


FIG. 9. — *Fractionnement de noyaux gris centraux.*

Cerveau normal.

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

fraction chloroformique indique d'après son Rf qu'il s'agit de stérides. De toutes façons elle ne peut être attribuée à des lipides phosphorés car il n'y a pas de phosphore lipidique dans la fraction chloroformique.

— dans la fraction 15/1 :

  — les deux taches superposées en (h) sont des acides glycérophosphatidiques (160).

  — au-dessous se situent les phosphatidyléthanolamines en (g) et les phosphatidylsérines en (f).

— dans la fraction 4/1 on retrouve les spots (g) et (f) tandis qu'en (e) apparaissent les plasmalogènes.

— dans la fraction 7/1, phosphatidyléthalonamines et phosphatidylsérines sont très bien séparées. Les plasmalogènes sont nettement individualisés. Les inositides se précisent en (d).

— dans la fraction 4/1 les inositides sont encore bien visibles en (d).

— dans la fraction 3/2 une seule tache de lécithine est visible en (c) et se retrouve :

— dans la fraction 5/4 dont elle est la seule tache importante. Les sphingomyélines apparaissent en (b) tandis que nous retrouvons deux taches en (f) et (g).

Nous pensons que ces deux taches sont constituées par des phosphatidylsérines qui ont conservé un cation K ou Na (73).

— dans la fraction 1/1 les lécithines s'estompent, les sphyngomyélines s'affirment en (b).

— dans la fraction méthanolique il existe une tache en (b) dont le Ri correspond à celui des sphingomyélines.

En résumé :

Nous voulons insister sur les deux taches dont le Rf est celui des phosphatidylsérines dans la fraction 5/4 et que nous avons assimilées à des phosphatidylsérines liées au cation Na.

Nous n'avons pas retrouvé de lysocithine sur cette chromatographie de noyaux gris centraux de cerveau normal.

F. - Comparaison de nos résultats

Au terme de cette étude chromatographique des phospholipides de :

Substance blanche,

Corps calleux,

Substance grise,

Noyaux gris centraux,

de cerveaux présumés normaux nous pouvons essayer de tirer certaines conclusions.

1. — Des acides phosphatidiques et éventuellement des polyglycérol-phosphatides ont été retrouvés dans la fraction 15/1 de noyaux gris centraux.

2. — En ce qui concerne les céphalines nous avons pu mettre en évidence deux groupes de phosphatidylsérines :

— certaines sont éluées avec les fractions céphaliniques,

— d'autres sont éluées dans les fractions 3/2, 5/4, c'est-à-dire comme les phosphatidylsérines possédant un cation Na (MARINETTI, RATHBONE), (121), (148).

3. — Le double spot d'inositides retrouvé sur le chromatogramme de substance grise correspond à des inositolphosphatides mono- et polyphosphorés.

4. — Nous avons pu caractériser les plasmalogènes à éthanolamine et sérine d'une part et à choline d'autre part ; leur séparation en particulier des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines apparaît satisfaisante.

5. — Enfin il semble que nous puissions affirmer la présence de lysocithines dans les extraits de substance grise et de corps calleux de cerveaux normaux.

Il est légitime de se demander si les lysocithines ne se forment pas durant l'intervalle séparant l'instant de la mort et le début de l'extraction. Nous avons donc étudié l'influence du vieillissement.

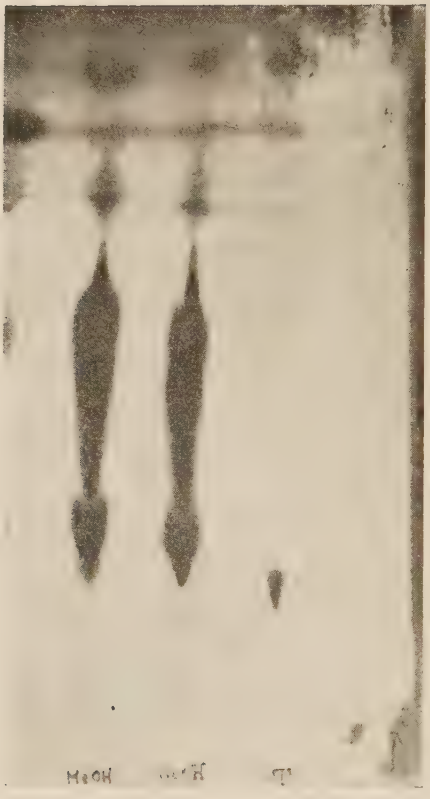
6. — Influence du vieillissement.

A la suite de l'hypothèse formulée par certains auteurs (88) de l'apparition des lysocithines au cours du vieillissement des tissus, il nous a paru intéressant de vérifier si les lysocithines pouvaient être un artéfact se produisant après la mort. Pour cela nous avons étudié en parallèle un cerveau de lapin dont la tête était immédiatement immergée dans l'air liquide après décapitation et le même cerveau après réchauffement dans les conditions d'expériences réalisées pour nos cerveaux humains.

Le dosage de phospore lipidique, et pour une prise d'essai identique le chromatogramme, ne montrent pas une augmentation de lysocithines chez le lapin mis dans les conditions d'expérience du cerveau humain. Il y a au contraire une tache plus apparente sur la piste correspondante au lapin tué dans l'air liquide (Figure 10).

Nous avons pu constater que les deux chromatogrammes sont superposables et surtout que la présence de lysocithines est observée dans les deux fractions méthanoliques.

Cela semblant prouver de façon certaine que les lysocithines ne se produisent pas après la mort mais sont un constituant normal du cerveau de lapin.



I II III

FIG. 10. — *Fraction méthanolique de cerveaux de lapin.*

I : Cerveau immergé dans l'air liquide.
II : Cerveau prélevé selon la méthode habituelle.
III : Témoin de lysocithines.

III. - Fractionnement de cerveaux pathologiques

Nous avons prélevé les cerveaux de malades décédés de coma hépatique.

Les trois malades dont nous avons étudié l'encéphale avaient en commun :

— une affection cirrhotique par éthylisme chronique,

— un coma d'origine hépatique ;
ce dernier, ayant été précédé de signes neurologiques d'encéphalopathie porto-cave, s'accompagnait :

  — d'un ictère,

  — d'une hyperammoniémie supérieure à 150 µg % pour des dosages répétés (méthode de CONWAY modifiée, donnant des valeurs normales de 20 à 40 µg % ml de sang).

Pour les cerveaux B et C ont été étudiés :

— Substance grise,

— Substance blanche,

— Noyaux gris centraux,

— Corps calleux.

Pour le cerveau A uniquement :

— Substance grise,

— Substance blanche.

L'extraction, la purification ont été réalisées selon le processus habituel.

A. - Substance blanche.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

a) *Prise d'essai.*

Cerveau A

— 3 ml de chloroforme contenant 160 mg de lipides et 1755 µg de phosphore lipidique.

Cerveau B

— 8 ml de chloroforme contenant 240 mg de lipides et 3889 µg de phosphore lipidique.

Cerveau C

— 7 ml de chloroforme contenant 117 mg de lipides et 3150 µg de phosphore lipidique.

b) *Teneurs en phosphore.*

Nous avons obtenu les résultats suivants : (Tableau n° VI).

c) Comparaison avec la substance blanche normale.

Par comparaison avec les résultats du dosage de phosphore lipidique de la substance blanche du cerveau normal, nous retrouvons des analogies et des différences :

Fractions	Teneurs en P lipidique des fractions					
	A		B		C	
	µg.	%	µg.	%	µg.	%
CHCl 3	0	0	0	0	0	0
15/1	0	0 à 1	0	0 à 1	0	0 à 1
12/1	0	0 à 1	0	0 à 1	154	5
7/1	425	28	945	26	589	19
4/1	90	6	432	12	510	17
Total...		34		38		41
3/2	425	28	540	15	526	17
5/4	400	26	1180	35	778	26
1/1	130	9	400	10	256	7
Total...		63		60		50
MeOH	44	3	66	2	235	7
Total ..	1514		3563		3048	

TABLEAU n° VI.

Dosage du phosphore lipidique de la substance blanche de cerveau pathologique

Pour les cerveaux :

A — 1514 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 1755 mis sur colonne, soit 90 %.

B — 3563 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 3880 mis sur colonne, soit 90 %.

C — 3048 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 3150 mis sur colonne, soit 98 %.

— Deux pics semblables de phosphore : dans les fractions 7/1 et 3/2 comme dans le cerveau normal. ;

— Cependant une différence essentielle réside dans la teneur en phosphore des premières fractions.

En effet, nous constatons que 15/1 et 12/1 sont pratiquement dépourvues de phosphore, les taux que nous retrouvons sont infimes, à peine suffisants pour justifier la présence de quelques taches de céphalines que nous trouverons sur les chromatogrammes à condition que la prise d'essai soit très concentrée.

Sur un tableau comparatif :

	Cerveau pathologique	Cerveau normal
A	34 %	58 %
B	38 %	60 %
C	41 %	49 %

TABLEAU n° VII

Pourcentage de phosphore céphalinique

Nous remarquons que le taux moyen de phosphore des céphalines pathologiques est de l'ordre de 37,3 contre 55,6 % pour le taux trouvé dans les cerveaux présumés normaux.

Nous préciserons qu'il ne s'agit pas d'un retard d'élution et d'un passage dans les fractions plus riches en méthanol car il n'y a pas de céphalines après la fraction 4/1.

Le reste du fractionnement présente moins d'intérêt. Il faut toutefois constater que les deux fractions suivantes 3/2, 5/4

de substance blanche pathologique sont sensiblement superposables avec :

Cerveau A : 63 %,
Cerveau B : 60 %,
Cerveau C : 50 %, de phosphore lipidique.

— Au contraire, ces taux sont pour le cerveau normal et pour les fractions correspondantes :

Cerveau A : 29 %,
Cerveau B : 36 %,
Cerveau C : 44 %, de phosphore lipidique.

— Cela nous montre que les lécithines ont augmenté non seulement en apparence, leur pourcentage s'accroît quand celui des céphalines baisse, mais aussi en valeur absolue. L'abaissement de 20 % des céphalines dans la substance blanche de cerveau pathologique conduirait à des pourcentages de lécithines de :

Cerveau A : 44,1 %
Cerveau B : 41,3 %
Cerveau C : 45 %

— Or ces trois valeurs sont très nettement inférieures aux pourcentages que nous avons indiqués.

L'augmentation réelle des lécithines que nous pourrions déduire de ces valeurs serait de 5 à 18 %.

— Les fractions méthanoliques sont identiques pour A et B ; seul C est plus élevé et ceci s'explique d'une part par la présence de sphingomyélines en quantité importante, d'autre part par la présence de lécithines incomplètement éluées auparavant comme le montre la chromatographie en couche mince.

II. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

a) Prise d'essai.

3 à 4 µg de phosphore lipidique.

La substance blanche du cerveau A a été fractionnée sur papier imprégné d'acide silicique. (Figure 11).

Le chromatogramme reste comparable à celui de la substance blanche de cerveau normal en ce qui concerne les fractions 4/1, 3/2, 5/4, 1/1 et chloroforme. Cependant dans les premières fractions, la ninhydrine n'identifie les céphalines qu'en 12/1 où la tache est très faible, ce sont des phosphatidyléthanolamines.

En 7/1, les phosphatidyléthanolamines donnent une volumineuse tache en (g),

les phosphatidylsérines en (f),

les plasmalogènes en (e),

les inositides en (a).

Il faut noter :

— un début de migration tardif des céphalines, pratiquement en 7/1,

— leur absence après la fraction 4/1,

— l'absence de lysocithines.

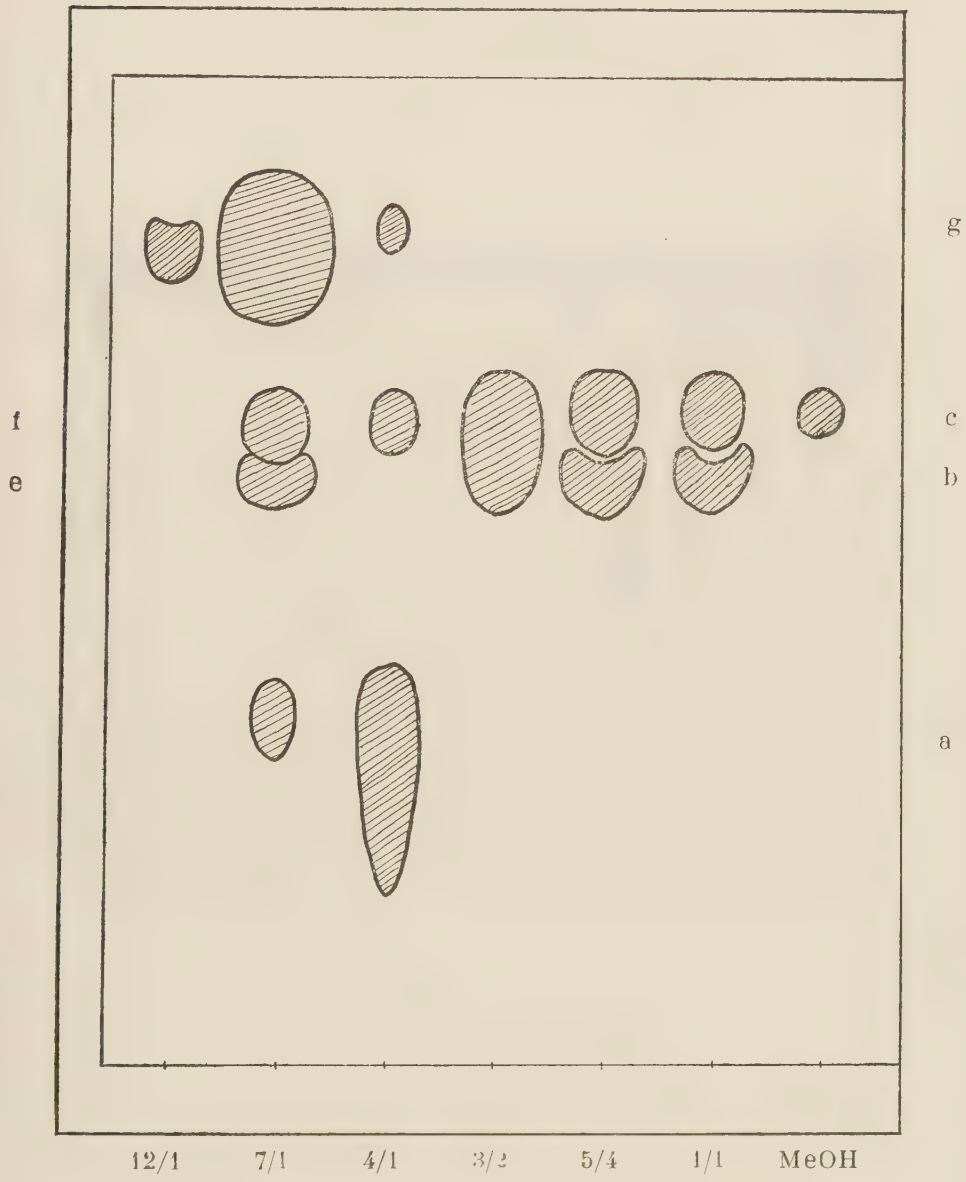


FIG. 11. — *Substance blanche de cerveau hépatique. Coloration à la Rhodamine 6 G.*

III. — CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

Celle-ci a été réalisée sur plaque de silicagel avec coloration par l'acide phosphomolybdique. (Figure 12).

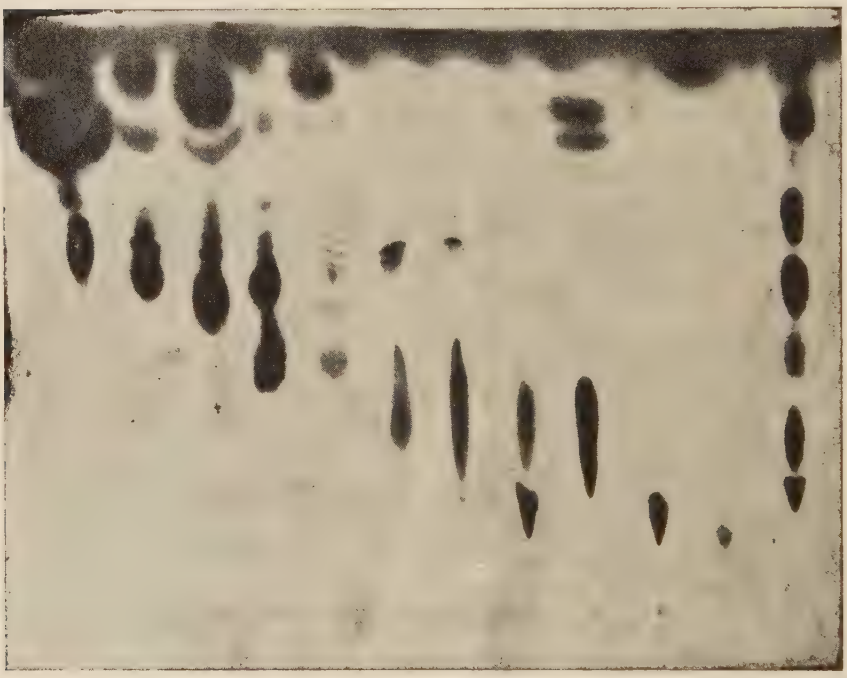


Fig. 12. — *Chromatogramme de substance blanche.*

Cerveau hépatique

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

T 1 = Témoin de lécithines.
T 2 = Témoin de lysocithines.
Ext. = Extrait total.

La première piste correspond à l'extrait total ; on remarque que chaque groupe de phospholipides est présent.

— sphyngomyélines en (b),

— lécithines en (c),

— inositides en (d),

— plasmalogènes en (e),

— phosphatidylsérines en (f),

— phosphatidyléthanolamines en (g),

— acide phosphatidique en petite quantité en (h).

Les fractions 15/, 12/1 montrent en (g) et (f) les phosphatidyléthanolamines et sérines, en (h) les acides phosphatidiques, en (e) les plasmalogènes, ceci pour des concentrations suffisantes de la prise d'essai.

— en 7/1 on retrouve les mêmes constituants,

— en 4/1 les céphalines azotées s'épuisent, tandis qu'apparaissent les inositides en (d).

Nous remarquons que sur la fraction suivante 5/2 réalisée par nouvelle chromatographie de la fraction 4/1, il existe deux taches (d') et (d'') correspondant aux inositides.

Le témoin de lécithines situe celles-ci dans les fractions 3/2, 5/4, 1/1 en (c).

Les lysocithines, si elles existent, ne sont pas séparées ici des sphingomyélines.

Cependant, sur une piste isolée. en parallèle avec un témoin de lysocithine, et en augmentant la prise d'essai (4 μg de phosphore lipidique) nous avons pu faire apparaître un spot de lysocithines.

En résumé :

Nous insisterons sur la différence existant entre la substance blanche du cerveau présumé normal et celle de cerveau de coma hépatique ; cette différence consiste essentiellement :

— en une diminution importante des céphalines ; elle est de l'ordre de 18 %,

— En une augmentation de la fraction lécithinique.

B. - Corps calleux.

Le Corps calleux des cerveaux B et C a été prélevé et fractionné selon la technique précédemment exposée.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

a) *Prise d'essai.*

— Cerveau B :

5 ml de chloroforme contiennent 154,2 mg de lipides et 2500 µg de phosphore lipidique.

— Cerveau C :

10 ml de chloroforme contiennent 232 mg de lipides et 4500 µg de phosphore lipidique.

b) Teneurs en phosphore :

Nos résultats sont groupés dans le tableau n° VIII.

Fractions	Teneurs en P lipidique des fractions			
	B		C	
	µg.	%	µg.	%
$CHCl_3$	0	0	0	0
15/1	95	4	0	0
12/1	585	25	1138	26
7/1	428	19	750	18
4/1	162	7	360	9
Total.....		55		53
3/2	600	26	484	12
5/4	272	12	896	22
1/1	105	4	475	11
Total		42		45
MeOH	70	3	88	2
Total	2317		4191	

Tableau n° VIII.

Dosage du phosphore lipidique des fractions de corps calleux pathologiques.

Pour les cerveaux :

— B : 2317 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2500 mis sur colonne, soit 92 %.

— C : 4191 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 4500 mis sur colonne, soit 93 %.

Le groupement des quatre premières fractions 15/1 à 4/1 nous donne pour les deux cerveaux un pourcentage de :

55 % pour le cerveau B,
53 % pour le cerveau C.

Celui des trois fractions suivantes 3/2, 5/4, 1/1 est égal à :

42 % pour le cerveau B,
45 % pour le cerveau C.

c) Comparaison avec le Corps calleux normal.

Les valeurs de phosphore lipidique des fractions céphaliniques des cerveaux normaux et pathologiques sont indiquées dans le tableau n° IX.

	Normaux	Pathologiques
Cerveau C	47 %	55 %
Cerveau B	50 %	53 %

Tableau n° IX.

Comparaison entre les fractions céphaliniques.

On retrouve une différence entre les dosages de phosphore céphalinique (cinq premières fractions) pour les cerveaux normaux et les cerveaux pathologiques, avec un excès moyen de 5 % en faveur du cerveau pathologique.

Nous retenons cette différence de 5 % tout en reconnaissant qu'elle pourrait être voisine des variations physiologiques.

De plus nous notons que la fraction 15/1 est très pauvre en phosphore lipidique dans le cerveau B ; ce taux devient presque nul dans le cerveau C pathologique.

— Quant aux fractions de lécithines et sphingomyélines elles montrent, bien sûr, la même variation avec un excès de lécithines et sphingomyélines pour le cerveau normal. mais qui n'est que de l'ordre de 1 à 2 % donc trop peu important pour qu'on y attache une véritable signification.

II. — CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

Nous ne reproduisons pas cette chromatographie car elle est superposable à celle du corps calleux normal.

Cependant il est intéressant de noter la présence de lysocithines dans la phase méthanolique. Nous allons revenir sur ce point.

L'étude de ces résultats ne nous permet d'apporter aucune conclusion importante en dehors de la diminution notable des giques sont sensiblement superposables,sauf pour les fractions 15/1.

En résumé :

— Les valeurs de phosphore lipidique, des différentes fractions d'élution des corps calleux normaux et pathologiques sont sensiblement superposables sauf pour les fractions 15/1.

— Il existe des lysocithines dans la fraction méthanolique du cerveau pathologique.

C. - Substance grise.

Après dissection, extraction des lipides et purification selon la technique décrite précédemment, nous procédons à un fractionnement sur colonne.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

a) *Prise d'essai.*

Cerveau A

— 3 ml de chloroforme contenant 60 mg de lipides et 865 µg de phosphore lipidique.

Cerveau B

— 6 ml de chloroforme contenant 104 mg de lipides et 2021 µg de phosphore lipidique.

Cerveau C

— 6 ml de choroforme contenant 103 mg de lipides et 2200 µg de phosphore lipidique.

b) Teneur en phosphore.

Dans les quatre premières fractions 15/1, 12/1, 7/1 et 4/1, les taux de phosphore lipidique additionnés donnent comme résultats : (Tableau n° X).

Cerveau A : 48,5 %
Cerveau B : 47 %
Cerveau C : 49 %

Les trois fractions suivantes, 3/2, 5/4, 1/1 ont ensemble :

Cerveau A : 42 %
Cerveau B : 50 %
Cerveau C : 45 %

Fractions	Teneur en P lipidique des fractions					
	A		B		C	
	µg.	%	µg.	%	µg.	%
$CHCl_3$	0	0	0	0	0	0
15/1	25	3	60	4	50	2
12/1	12	1	81	5	170	8
7/1	192	24,5	434	25	526	25
4/1	154	20	225	13	300	14
Total...		48,5		47		49
3/2	90	11	602	37	274	13
5/4	195	25	162	10	571	27
1/1	42	6	48	3	111	5
Total...		42		50		45
MeOH	60	8	49	3	140	6
Total...	770		1661		2142	

TABLEAU n° X

Dosage du phosphore lipidique de substance grise pathologique

Pour les cerveaux :

A — 770 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 865 mis sur colonne, soit 90 %.

B — 1661 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2021 mis sur colonne, soit 84 %.

C — 2142 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2200 mis sur colonne, soit 98 %.

Nous pouvons remarquer combien les pourcentages du phosphore lipidique des groupes de fraction sont ici plus concordants que pour les cerveaux normaux ou présumés tels ; il est évident que cela peut être dû à la maladie commune et aux conditions identiques de régime ou de traitement.

c) Comparaison avec la substance grise de cerveau normal.

Par comparaison avec la substance grise normale, les chiffres sont superposables.

En effet, les valeurs moyennes des céphalines sont sensiblement les mêmes, ainsi que celles du 2^{me} groupe de phospholipides correspondant aux lécithines et sphingomyélines.

II. — CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

L'étude de ce chromatogramme permet les constatations suivantes : (Figure 13).

— Sur la fraction 15/1 nous retrouvons les taches (h) et (g) qui selon nos développements antérieurs correspondent aux .

Acides phosphatidiques (h)
Phosphatidyléthanolamines (g)
Phosphatidylsérines (f).

— En 12/1, phosphatidyléthanolamines (g) et sérines (f) sont très bien séparées ; en (e) apparaissent les plasmalogènes.

— Les pistes 7/1 et 4/1 montrent une augmentation des plasmalogènes tandis que les phosphatidyléthanolamines d'abord en 7/1 puis les phosphatidylsérines en 4/1 disparaissent.

— En 4/1, les phosphatidylinositols ont migré en (d). Pour le vérifier, nous avons placé à la gauche du chromatogramme un éluat par 5/2 d'une partie de cette fraction 4/1. Nous y constatons la tache d'inositides presque isolée (comme indiqué page 52).

— En 3/2, quelques plasmalogènes persistent mais un intérêt certain provient de la comparaison des fractions 3/2, 5/4 et 1/1. En effet, le témoin placé à droite de 1/1 identifie les lécithines en (c) sur les trois pistes.

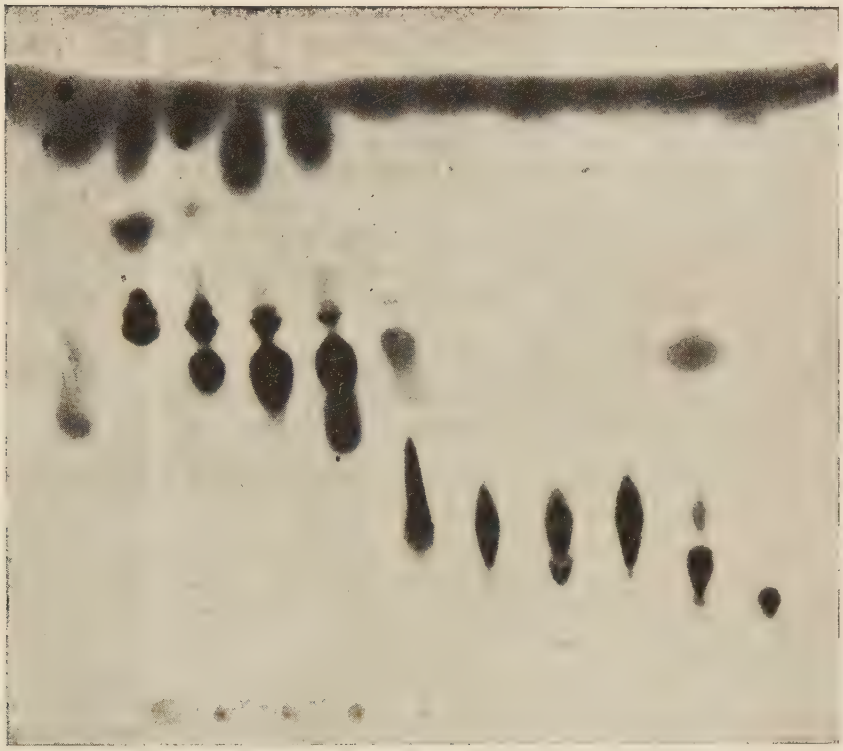


FIG. 13. — *Chromatoplaque de substance grise.*

Cerveau pathologique.
Coloration à l'acide phosphomolybdique.

De plus, il existe une tache surmontant (c) et non séparée d'elle, détectée par le réactif de DRAGGENDORFF mais aussi par le réactif de SCHIFF. Il s'agit d'après nous de plasmalogènes à choline. Sur 1/1 est noté un spot de sphingomyéline à l'extrémité inférieure de (c).

La fraction méthanolique enfin montre en (c) de faibles traces de lécithines, en (b) les shyngomyélines et surtout au-

dessous, en (a), une tache de lysocithine identifiée par le témoin voisin.

En résumé :

Les deux chromatogrammes de substance grise normale et pathologique sont quasi identiques comme l'était le dosage du phosphore lipidique pour les différentes fractions.

Les deux seules différences notées sont :

— un meilleur fractionnement des céphalines : phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et plasmalogène sur le chromatogramme de substance grise pathologique,

— et la distinction de deux taches d'inositides sur celui de substance grise normale.

Il est important de noter que les lysocithines sont retrouvées sur les deux chromatographies normale et pathologique.

D. - Noyaux gris centraux.

Ceux-ci sont prélevés à partir des deux cerveaux B et C et traités de la même façon que les autres régions étudiées.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

a) Prise d'essai.

Cerveau B

— 6 ml de chloroforme contenant 168 mg de lipides et 2520 µg de phosphore lipidique.

Cerveau C

— 7 ml de chloroforme contenant 218 mg de lipides et 3500 µg de phosphore lipidique.

b) *Teneurs en phosphore.*

Nos résultats sont groupés dans le tableau n° XI.

Fractions	Teneur en P lipidique des fractions			
	B		C	
	µg.	%	µg.	%
$CHCl_3$	0	0	0	0
15/1	24	0	0	0
12/1	144	6,5	750	23
7/1	890	41	600	18
4/1	70	3	360	11
Total.....		50,5		52
3/2	589	27	210	6
5/4	245	11	960	29
1/1	60	2,5	216	6
Total		40,5		41
MeOH	176	8	198	6
Total	2198		3294	

TABLEAU n° XI

Teneur en phosphore lipidique des fractions de noyaux gris centraux pathologiques.

Pour les cerveaux :

B — 2198 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 2520 mis sur colonne, soit 90 %.

C — 3294 µg de phosphore lipidique sont retrouvés dans les éluats pour 3500 mis en colonne, soit 93 %.

c) *Comparaison avec les noyaux gris centraux de cerveau normal*

La comparaison des teneurs de phosphore lipidique entre les noyaux gris centraux des cerveaux présumés normaux et pathologiques montre certaines différences.

1° — Le taux moyen du phosphore des céphalines est de :

— 50,5 % pour le cerveau pathologique,

— 43 % pour le cerveau normal,

soit 7,5 % de différence, ce qui peut être considéré comme faible.

2° — Cette différence est, par contre, de 14 % pour les trois fractions 3/2, 5/4, 1/1, soit :

— 40,5 % pour le cerveau pathologique,

— 54,5 % pour le cerveau normal.

L'écart est ici plus important : il peut être dû au fait que certaines lécithines des cerveaux pathologiques retenues sur la colonne ont été seulement éluées, comme les lysolécithines, par la fraction méthanolique. Cependant, cette explication ne suffit pas : il y a, en effet, 2 à 3 % de phospholipides dans la fraction méthanolique du cerveau normal et 6 à 8 % dans la fraction identique de cerveau pathologique ; une raison metabolique pourrait expliquer cette différence de 14 %.

II. — CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

Le chromatogramme de noyaux gris centraux de cerveau pathologique (Figure 14) est sensiblement *identique* à celui des noyaux gris centraux normaux.

Fig. 14. — *Chromatoplaque de noyaux gris centraux*

Cerveau pathologique.

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

— La piste 15/1 montre en (g) les phosphatidyléthanolamines,

— en 12/1 et 7/1, nous retrouvons,

- les acides phosphatidiques (h) élués cette fois en 12/1,
- les phosphatidyléthanolamines (g),
- les phosphatidylsérines en (f),
- leurs plasmalogènes en (e).

— dans la fraction 4/1 apparaît une tache (d) d'inositides.

— le reste du chromatogramme est banal, mais dans la fraction méthanolique on notera la présence de lysocithines.

— la piste de droite correspond à l'extrait total ; elle est intéressante par les taches (i) et (h) qui sont des acides phosphatidiques.

En résumé :

Nous noterons :

— la diminution de 14 % de la teneur de phosphore lipidique des fractions 3/2, 5/4, 1/1 de noyaux gris centraux de cerveau normal.

— la présence de lysocithines dans sa fraction méthanolique.

E. - Etude des lysocithines

Avant de terminer l'exposé de nos recherches, il nous paraît indispensable de revenir sur la question des lysocithines que nous avons rencontrées dans certaines parties de l'encéphale. Nous n'en avons jamais trouvé dans la substance blanche sous corticale du cerveau normal. Par contre, nous en trouvons dans le corps calleux.

Au niveau de la substance grise normale, nous avons pu caractériser par nos chromatogrammes de faibles quantités de lysocithines et nous avons pu montrer que celles-ci n'étaient pas dues au vieillissement. La question s'est révélée très importante dans nos recherches portant sur le cerveau des sujets ammoniémiques. Dans ce cas, nous trouvons toujours des quantités de lysocithines très faciles à caractériser comme le montre la chromatographie en couche mince représentée sur la figure 15, comparant les fractions méthanoliques des différentes régions de cerveau pathologique.

Toutes nos fractions : Substance grise, corps calleux, substance blanche, noyaux gris centraux permettent de reconnaître le spot des lysocithines dont la migration témoin s'est faite sur la piste de droite. Très caractéristiques dans la substance grise et le corps calleux, mal séparées des sphingomyélines dans la substance blanche, elles se retrouvent avec une netteté appréciable dans les noyaux gris centraux.

Ce fait nous paraît très important : il doit témoigner de la perturbation du métabolisme phospholipidique dans le coma hépatique. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion générale.

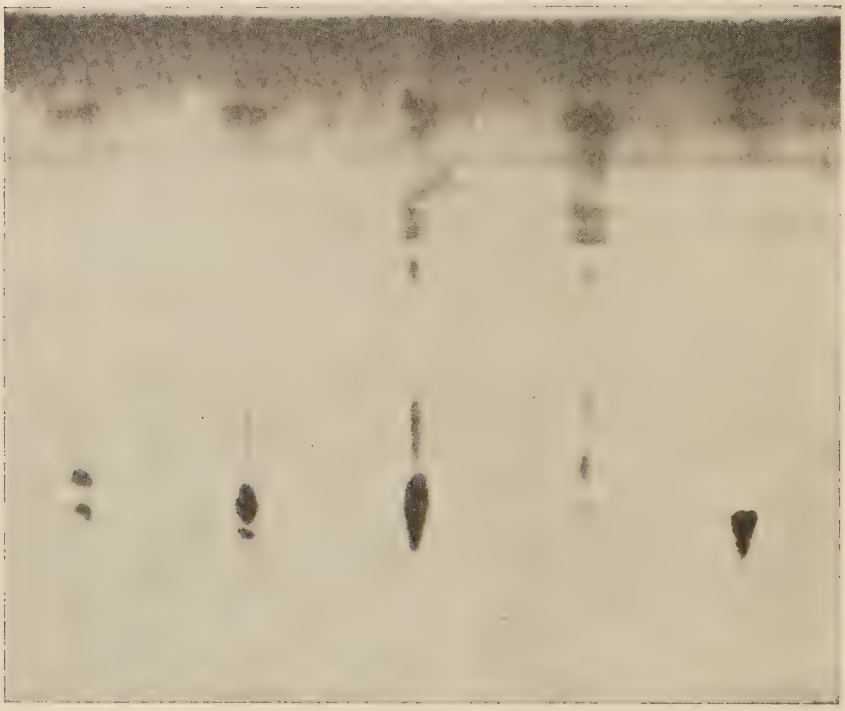


Fig. 15. — *Chromatoplaque de fractions méthanoliques de cerveau pathologique.*

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

F. - Comparaison de nos résultats

Il ressort de cette étude des cerveaux normaux et des cerveaux prélevés après coma hépatique un certain nombre de variations phospholipidiques, quantitatives et qualitatives.

1) QUANTITATIVES.

Elles portent essentiellement sur la substance blanche et sur les noyaux gris centraux.

a) Substance blanche.

Des différences apparaissent en premier lieu dans la substance blanche. Nous notons en effet : (Figure 16)

— une différence de près de 20 % entre la teneur en phosphore lipidique des quatre fractions céphaliniques à l'avantage du cerveau normal.

— une augmentation des lécithines et sphingomyélines de l'ordre de 5 à 18 % dans la substance blanche pathologique.

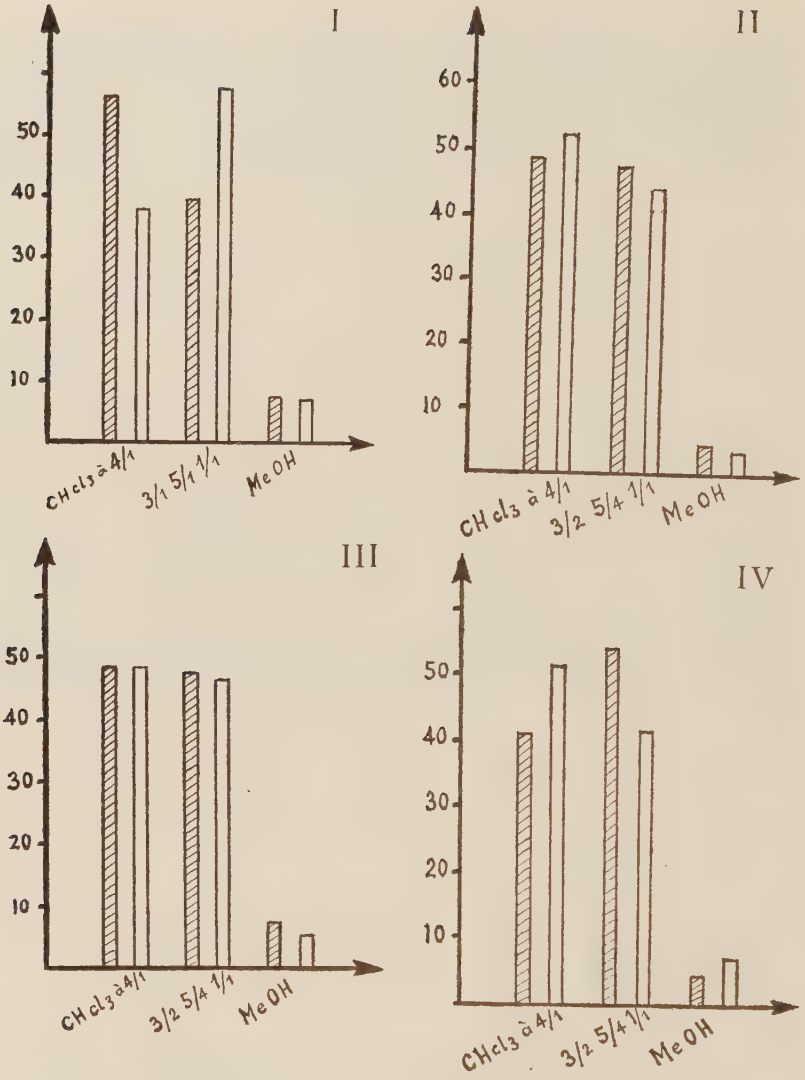
Le défaut de phosphore dans les fractions céphaliniques du cerveau pathologique est due à une diminution notable de phosphatides dans les fractions 15/1, 12/1 correspondant plus particulièrement aux phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines.

Cela est confirmé par les chromatographies sur papier et en couche mince.

b) *Corps calleux.*

En ce qui concerne le corps calleux, nous mettons en évidence :

— une augmentation de l'ordre de 5% du phosphore lipidique des fractions céphaliniques mais celui des autres fractions est très voisin et nous n'osons pas interpréter cette différence.



(FIG. 16).

Comparaison des teneurs de phosphore lipidique entre les différentes régions étudiées dans les cerveaux normaux et pathologiques.

I. Substance blanche.
II. Corps calleux.
III. Substance grise
IV. Noyaux gris centraux.

c) Substance grise.

La substance grise offre des teneurs en phosphore lipidique et des chromatographies sur couche mince qui sont absolument identiques pour les substances grises des deux cerveaux.

d) *Noyaux gris centraux.*

Quant aux noyaux gris centraux, ils montrent :

— une augmentation de 7,5 % de phosphore lipidique céphalinique dans les cerveaux pathologiques,

— un déficit de 14 % pour les fractions lécithiniques de cerveaux pathologiques. Nous avons vu qu'il devait tenir à une diminution propre des lécithines.

2) QUALITATIVES.

Celles-ci ont été relevées sur les chromatographies sur papier et sur couche mince.

— Nous notons tout d'abord une similitude assez intéressante : c'est la présence de deux spots ayant le Rf des acides phosphatidiques, (Figures 9 et 13) retrouvés dans les extraits de noyaux gris centraux normaux et pathologiques.

— Nous avons pu mettre en évidence également l'existence de lysocithines dans les quatre régions étudiées des cerveaux pathologiques.

IV. - Expérimentation chez le chien

L'obtention de tels résultats à partir de cerveaux de coma hépatique avec hyperammoniémie, nous a conduit à tenter leur vérification expérimentale chez l'animal.

Le coma hépatique éthylique que nous avons envisagé, est l'aboutissant d'une défaillance chronique et progressive du parenchyme hépatique. Parmi les fonctions du foie, la plus altérée et sûrement la plus en cause dans l'apparition du coma est la réalisation du cycle uréogénique de KREBS : l'organisme a perdu la possibilité de transformer l'ammoniaque en urée dans le foie. Or depuis les travaux de UNDERHILL et KOPSINOV (175) on sait que l'ammoniaque est toxique, particulièrement pour le système nerveux central.

Nous avons donc cherché à réaliser des hyperammoniémies.

A. — CHOIX DU PRODUIT.

Celles-ci peuvent être produites :

— soit par hépatectomie,

— soit par diverses substances chimiques (67). (159) :

Sels d'ammonium,

Acétazolamide,

Hydroxylamine.

L'hépatectomie ne permet de réaliser que des intoxications aiguës conduisant à la mort avant que des lésions encéphaliques comparables à celles du coma hépatique aient pu se produire.

Les sels minéraux d'ammonium entraînent une acidose et une perturbation métabolique surajoutée.

L'acétazolamide a une action pharmacodynamique et provoque une inhibition de l'anhydrase carbonique qui pourrait s'ajouter aux conséquences de l'intoxication ammoniacale.

Nous avons donc préféré utiliser le chlorhydrate d'hydroxylamine.

Ce produit a un double avantage : peu toxique il permet de réaliser une intoxication chronique lente comparable au processus cirrhotique ; l'augmentation de l'ammoniémie qu'il détermine est lentement progressive. Le mécanisme biochimique de l'action de ce composé nous a particulièrement intéressé : l'Hydroxylamine étant inhibitrice de la glutamodéhydrase doit favoriser la perturbation du métabolisme azoté.

Un inconvénient doit cependant être signalé dans ce choix :

— la production de nitrites et ses conséquences : hémolyse, méthémoglobinémie et méthémalbuminémie, comme nous avons pu le mettre en évidence.

En effet l'examen anatomopathologique, fait par le docteur J. Fabre,* a donné les résultats suivants :

FOIE : légère surcharge Kupfférienne de pigments hématiques - stéatose parcellaire diffuse.

REIN : surcharge en pigments sanguins des tubes proximaux.

Tout cela traduisant une hémolyse.

Nos recherches bibliographiques ne nous ont pas permis de trouver des lésions encéphalitiques dues aux nitrites. Nous

* Nous le remercions bien sincèrement.

pensons donc que ce n'est que par hyperammoniémie que l'hydroxylamine peut agir sur les animaux d'expérience (Blanc) (1946) (17).

B. — FRACTIONNEMENT COMPARATIF DES PHOSPHOLIPIDES CEREBRAUX.

— Chien normal,

— Chien après intoxication par l'hydroxylamine.

1. — **Conduite de l'expérimentation.**

Deux chiens ont été isolés et nourris de la même façon durant le temps nécessaire à l'intoxication lente de l'un d'eux.

a) Intoxication.

Un des animaux pesant 11 kg a reçu quotidiennement, per os, des doses croissantes de chlorhydrate d'hydroxylamine :

— à partir de 5 mg par kg de poids le premier jour (55 mg) , nous sommes parvenus, en augmentant les doses très progressivement, à une dose maximum de 550 mg par jour au centième jour.

Mais à partir du cent-dixième jour le chien étant devenu très anorexique. les doses quotidiennes étaient difficilement appréciables en raison de cette anorexie. L'animal n'ingérait plus que des doses très minimes.

b) Sur le plan clinique.

La première manifestation survenue vers le centième jour a été l'anorexie, s'accompagnant d'un important amaigrissement.

Au cent trentième jour environ est apparue une oligurie avec urines très brunes.

Progressivement avec un amaigrissement de trois kilos s'est installé un état de dénutrition intense et une anurie qui s'est prolongée pendant trois jours jusqu'au sacrifice du chien.

c) Sur le plan biologique.

Nous avons pratiqué régulièrement des dosages d'ammoniémie qui ont donné les résultats suivants (ces dosages étaient effectués une heure avant la prise des aliments et de la drogue) ;

	Chien témoin	Chien intoxiqué
15me jour	24 µg %	35 µg %
135me jour	30 µg %	70 µg %
140me jour	32 µg %	119 µg %
145me jour	30 µg %	140 µg %
150me jour	32 µg %	105 µg %

Dans les urines on note la présence de pigments biliaires, surtout d'urobiline et de méthémoglobine en grande quantité. Les urines ont une coloration brunâtre très intense.

— l'urée sanguine est à 0,20 g %,

— l'urée urinaire est à 35,5 g %,
pour 75 ml d'urines quotidiennes.

Les deux chiens sont sacrifiés par saignée, les cerveaux prélevés immédiatement et les lipides extraits dans les délais les plus brefs.

A partir de chaque cerveau nous avons extrait les lipides de :

— 5 g de substance blanche,
— 5 g de substance grise,
selon le processus habituel.

2. — **Fractionnement sur colonne.**

Nous avons fractionné sur colonne d'acide silicique et d'hyflo-supercel, une partie aliquote de chaque extrait lipidique purifié par le procédé de FOLCH.

a) Prise d'essai

Les fractionnements sont réalisés deux par deux à partir d'une quantité d'extrait identique pour chaque groupe.

— Cerveau normal :

Substance grise : 176 mg de lipides contenant 3600 µg de phosphore lipidique en solution dans 8 ml de chloroforme.

Substance blanche : 200 mg de lipides contenant 3800 µg de phosphore lipidique en solution dans 4 ml de chloroforme.

— Cerveau pathologique :

Substance grise : 103 mg de lipides contenant 2115 µg de phosphore lipidique en solution dans 9 ml de chloroforme.

Substance blanche : 116 mg de lipides contenant 2340 µg de phosphore lipidique en solution dans 9 ml de chloroforme.

b) Les fractionnements sur colonne pratiqués à partir de ces prises d'essai ont donné les résultats suivants (Tableau n° XII).

On peut noter dans ces résultats des variations importantes entre les teneurs en phosphore lipidique des fractions de substance grise et de substance blanche du chien normal et du chien pathologique.

Fractions	Substance grise		Substance blanche	
	Chien normal	Chien intoxiqué	Chien normal	Chien intoxiqué
$CHCl_3$....	0	0	0	0
15/1	4	2	8	4
12/1	23	3	24	4
7/1	17	8	12	5
4/1	9	13	8	13
Total	53	26	52	26
3/2	10	23	16	38
5/4	24	20	19	18
1/1	8	17	9	10
Total	42	60	44	66
MeOH	4	13	4	7

Tableau n° XII.

Pourcentage de Phosphore lipidique dans les fractions de substance grise et de substance blanche des chiens normal et pathologique.

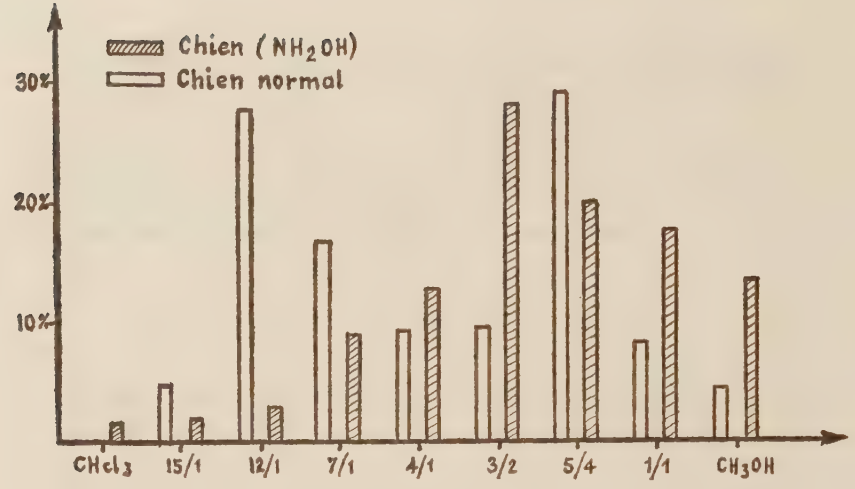


FIG. 17. — *Comparaison des pourcentages de P. lipidique des fractions de substance blanche.*

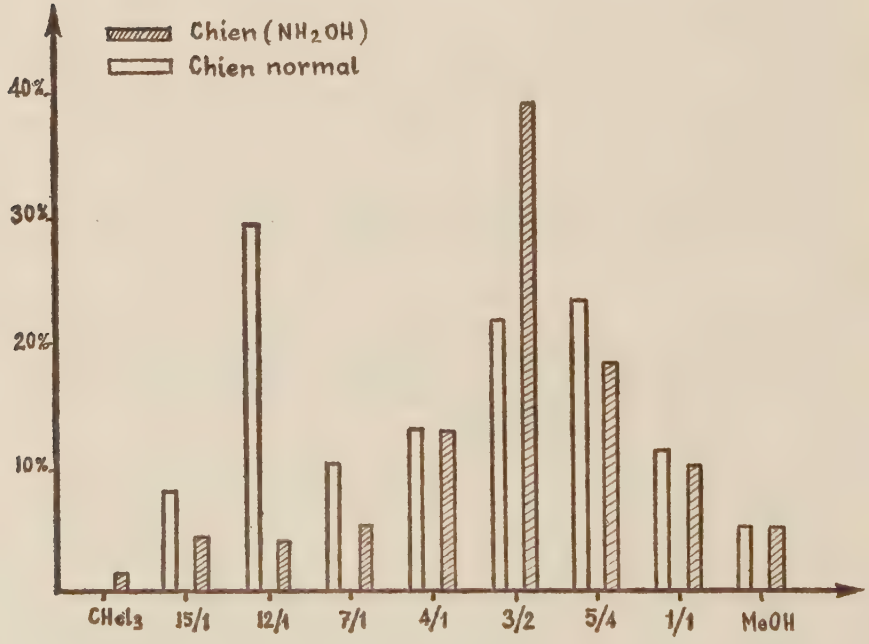


FIG. 18. — *Comparaison des pourcentages de P. lipidique des fractions de substance grise.*

Il existe une diminution de 26 % pour les fractions céphaliniques du chien intoxiqué.

— les fractions 15/1, 12/1 et 7/1 du cerveau de chien pathologique ont des taux très bas de phosphore lipidique, ce qui explique cette diminution :

— diminution de moitié pour la substance grise dans les fractions 15/1 et 7/1 (Figure 17),

— diminution de 23 % à 3 % dans 12/1.

— la substance blanche présente les mêmes perturbations (Figure 18) :

— 8 % et 4 %, 12 % et 5 % dans les fractions 15/1 et,

— 24 % et 4 % dans la fraction 12/1.

— On note par contre une richesse beaucoup plus grande de phosphore lipidique dans les fractions 3/2, 5/4 et 1/1 du chien intoxiqué — 22 % de plus — surtout marquée dans la fraction 3/2.

— Enfin, les fractions méthanoliques sont plus riches en phosphore lipidique chez le chien intoxiqué, ce qui pourrait laisser prévoir une quantité plus importante de lysocithines.

Or, si nous sommes généralement très réservés pour l'interprétation des teneurs en phosphore lipidique des différentes fractions isolées, nous pensons qu'elles acquièrent ici une grande importance.

Tout d'abord, parce que techniquement ces valeurs furent contrôlées et que les chiffres retrouvés au bas de la colonne impliquent une élution satisfaisante :

— pour le cerveau pathologique :

88 % du phosphore lipidique total pour la substance grise,
96 % pour la substance blanche
ont été retrouvés dans les éluats,

— pour le cerveau normal :

90 à 95 % du phosphore lipidique furent retrouvés après le fractionnement.

Enfin parce que nos chiens furent placés dans des circonstances semblables ; seule l'anorexie terminale aurait pu modifier partiellement la nutrition du chien intoxiqué.

En résumé :

Nous voulons insister sur cette diminution très nette des céphalines dans les fractions de 15/1 à 4/1.

La chromatographie en couche mince montre bien qu'il s'agit d'une véritable diminution, non pas d'un étalement des céphalines déplacées vers les fractions riches en méthanol.

3. — **Chromatographie en couche mince.**

Nous avons comparé entr'eux les chromatogrammes des substances blanches et des substances grises de chaque chien.

a) Comparaison de la substance blanche.

Nous avons utilisé des prises d'essai identiques de 3 μg de phosphore, et pu noter certaines constatations (Figures 19 et 20).

— La piste 15/1 montre les taches de céphalines : phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine (g) et (f). Celles-ci sont moins marquées dans la substance blanche du chien

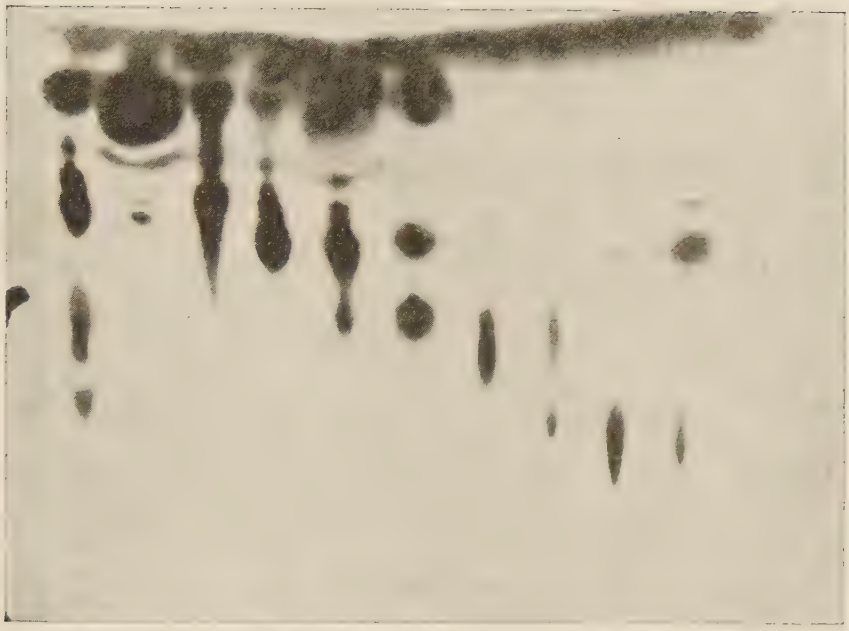


FIG. 19. — *Chromatoplaque substance blanche.*

Cerveau normal.

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

intoxiqué, malgré des prises d'essai identiques. C'est surtout la tache inférieure (f) qui est moins apparente sur la chromatographie de substance blanche du chien intoxiqué.

— La piste 12/1 est comparable sur les deux chromatogrammes.

— La piste 7/1 montre sur la chromatographie de chien normal :

— les inositides (d),
— les plasmalogènes (e),
— les céphalines (f) et (g).

Sur la chromatographie de chien intoxiqué, il n'y a pratiquement plus de céphalines sauf la tache de plasmalogènes suivie en (d) des inositides.

— La piste 4/1 met en évidence sur la chromatographie de chien normal une tache de plasmalogènes et une tache d'inositides.

Sur la chromatographie de chien intoxiqué, plasmalogènes et inositides se présentent de façon identique à la précédente.

— Les pistes 3/2 et 5/4 rendent compte de l'extrême richesse en lécithines (c) de la substance blanche de cerveau pathologique.

En 5/4 et 1/1 apparaissent sur les deux chromatographies les sphingomyélines bien visibles et en quantité abondante puisqu'il s'agit de substance blanche.

— La piste méthanolique enfin revêt un grand intérêt car pour une prise d'essai de phosphore lipidique identique, elle montre une très grande quantité de lysocithine dans le cerveau pathologique. Il y avait déjà une petite tache sur la fraction précédente 1/1. Au contraire, la substance blanche dans sa fraction méthanolique ne montre pas de tache de lysocithine.

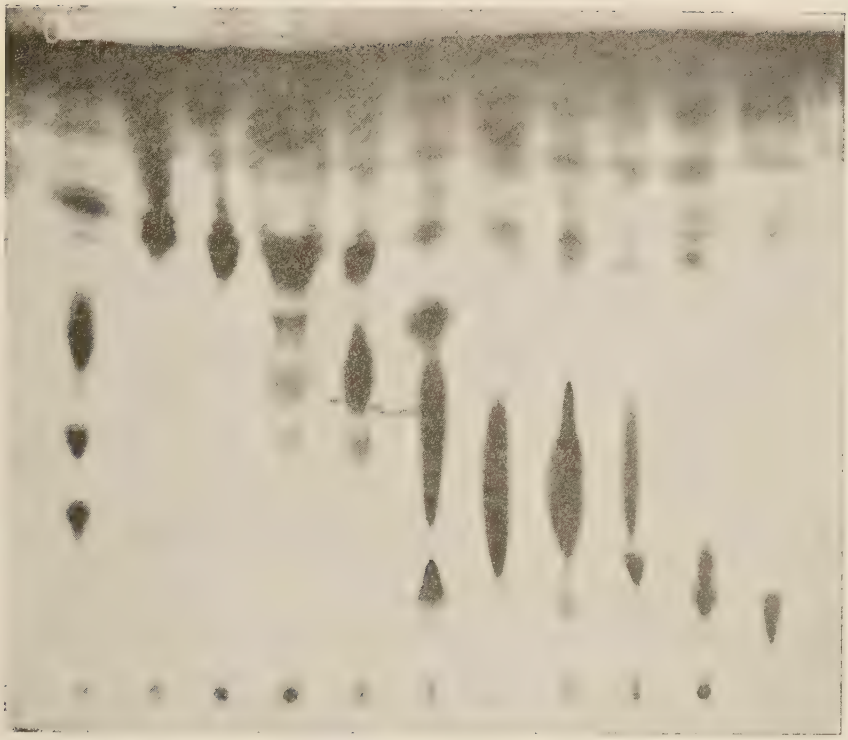


FIG. 20. — *Chromatoplaque de substance blanche.*
Chien NH OH.
Coloration à l'acide phosphomolybdique.

Par conséquent, sans tirer de conclusions formelles du fractionnement en parallèle de ces deux substances blanches, nous constatons trois faits importants :

a) la pauvreté en céphalines de ce cerveau intoxiqué,
b) la richesse en lécithines,
c) la présence de lysocithines.

2) *Comparaison de la substance grise:*

Nous n'analyserons pas dans le détail chaque piste de ces deux chromatographies puisque chaque tache a été déjà identifiée.

Nous insisterons cependant :

— sur la différence existant dans les premières fractions où les céphalines et leurs plasmalogènes sont en quantité moins importante dans le cerveau pathologique que dans le cerveau normal. (Figure 21).

— sur la présence de lysocithines dans le cerveau pathologique alors que pour la même quantité de phosphore lipidique dans la prise d'essai, elles sont à peine visibles sur la piste méthanolique du cerveau normal.

En résumé :

A la lumière de ces dosages de phosphore lipidique et des chromatographies, on peut énoncer quelques conclusions :

— la nette diminution du phosphore lipidique (22 %) dans les fractions céphaliniques (de 15/1 à 4/1) de substance grise et de substance blanche du cerveau de chien intoxiqué par rapport au chien normal.

— l'augmentation du phosphore lipidique dans les fractions 3/2, 5/4 et 1/1 de substance grise et blanche de cerveau de chien normal.

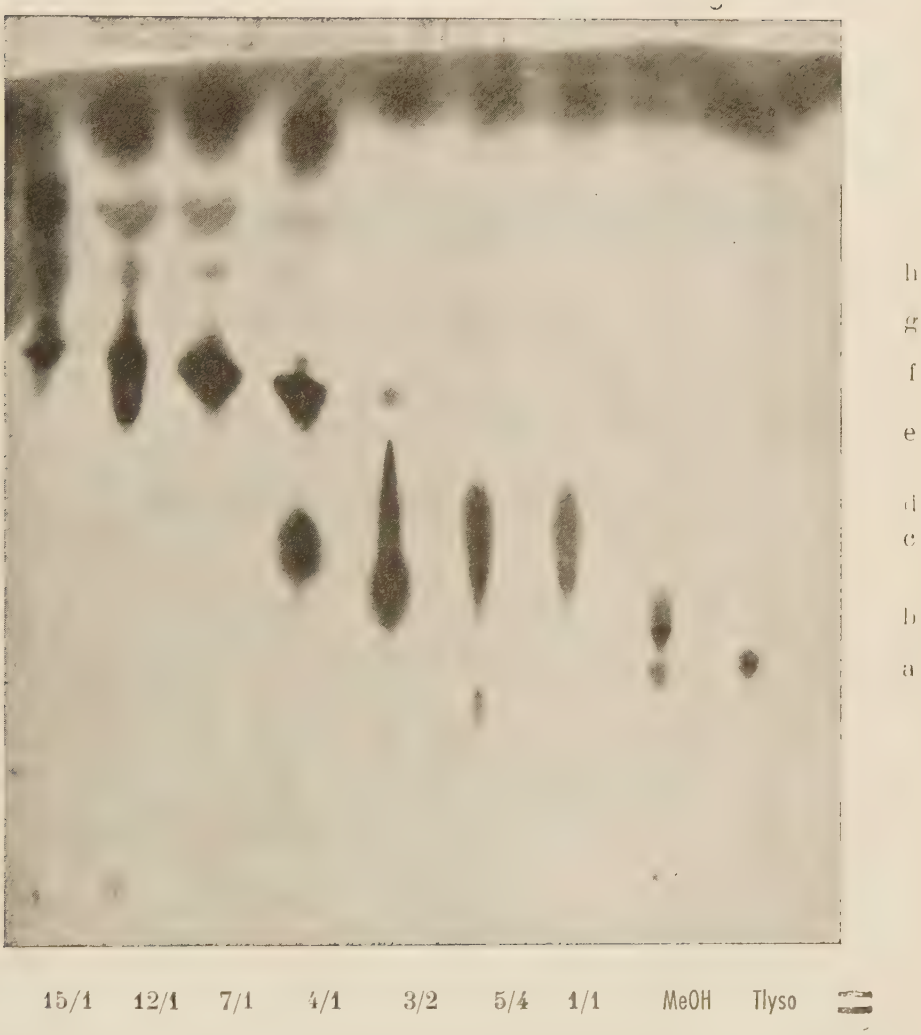


FIG. 20. — *Chromatoplaque substance grise.*

Chien NH_2OH.

Coloration à l'acide phosphomolybdique.

— enfin l'augmentation du phosphore lipidique dans la fraction méthanolique des deux substances encéphaliques de chien intoxiqué, en relation avec la présence de lysocithine.

Ces résultats sont quasi identiques à ceux rencontrés dans les cerveaux de sujets décédés de coma hépatique ; nous allons le voir dans la discussion des résultats.

CHAPITRE III

Discussion des Résultats

Dans la substance blanche sous corticale :

Nous notons pour les trois cerveaux humains pathologiques une diminution du phosphore lipidique de l'ordre de 18 % dans les fractions entraînées par les mélanges solvants riches en chloroforme.

Nous retrouvons chez le chien intoxiqué par l'hydroxylamine, une baisse comparable de 23 % dans ces mêmes fractions.

Dans les deux cas ce sont surtout les fractions 15/1 et 12/1 qui sont très pauvres en phospore lipidique, bien que l'ensemble de celles-ci soit perturbé jusqu'à 4/1.

Cela est en faveur d'une diminution :

— pour 15/1 : des acides phosphatidiques.
phosphatidyléthanolamines,

— pour 12/1 à 4/1 : des céphalines :
phosphatidylsérines,
leurs plasmalogènes,
inositolphosphatides.

Nous observons au contraire, une augmentation du phosphore lipidique dans les fractions éluées par les mélanges solvants riches en méthanol : 3/2, 5/4, 1/1.

— Elle est de l'ordre de 18 % pour les cerveaux pathologiques humains et de 20 % pour le cerveau de chien intoxiqué.

— Ce sont surtout les fractions 3/2 et 5/4 qui sont riches en phosphore lipidique.

— Cela est en faveur d'une augmentation :
  — pour 3/2, 5/4 des lécithines,
  — pour 1/1 des sphingomyélines.

Dans le corps calleux :

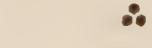
Il n'y a pas de différences marquées entre les cerveaux normaux et pathologiques.

Dans la substance grise :

Nous ne notons aucune modification, alors que le cerveau de chien intoxiqué montre une nette diminution des céphalines.

Dans les noyaux gris centraux :

Il faut retenir une diminution de la teneur en P. lipidique des fractions 3/2, 5/4, 1/1 de l'ordre de 14 % dans le cerveau pathologique.



A ces résultats quantitatifs, il convient d'ajouter les constatations tirées des chromatographies en couche mince, et dont nous retiendrons :

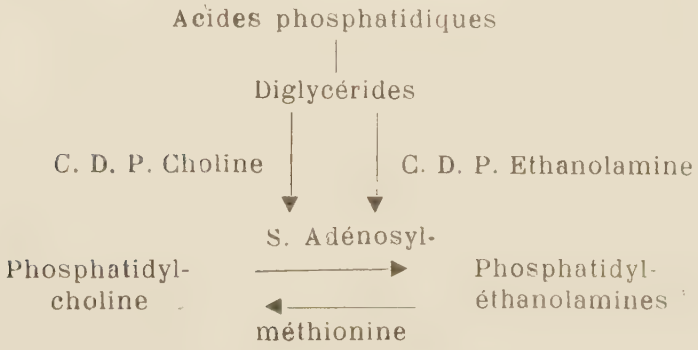
— la présence de lysocithines dans la substance grise des cerveaux normaux et leur existence infime dans le corps calleux,

— leur augmentation dans les cerveaux pathologiques où nous les retrouvons dans la substance grise et les noyaux gris centraux, dans la substance blanche sous corticale et le corps calleux.

Nous insisterons sur la présence de ces lysocithines dans l'extrait total et dans l'éluat méthanolique après fractionnement sur colonne d'acide silicique effectué à + 4° maximum, ce qui exclue leur formation par hydrolyse sur la colonne.

***

Le métabolisme des phosphatidylcholines et des phosphatidyléthalonamines passe par deux voies, comme nous le montre le schéma de KENNEDY reproduit partiellement ci-dessous :



On peut donc essayer d'expliquer le défaut de phosphatidyléthanolamines :

— soit par un défaut de synthèse,

— soit par un excès de transformation en phosphatidylcholine.

La synthèse des phosphatidyléthanolamines se fait tout d'abord par formation de phosphoryléthanolamine (DAWSON) (40).

KENNEDY et WEISS (92) ont mis en évidence dans le foie des enzymes capables de former la phosphatidyléthanolamine

à partir de phosphoryléthanolamine en présence de cytidine-diphosphate. Rossiter (152) et Dawson (40) ont montré que de telles réactions se produisent aussi dans le cerveau.

Dans des travaux ultérieurs Paulus et Kennedy ont à nouveau confirmé cette synthèse de la phosphatidyléthanolamine (135), (136), (91).

Enfin Nemer, Elwyn (128), Wilson et Gibson (185) ont précisé que la phosphatidyléthanolamine demande pour sa synthèse des groupes cytidine-di-phosphate et adénosyl-triphosphate. Elle peut être très diminuée s'il manque ces nucléotides phosphorylés.

Deux mécanismes peuvent abaisser ces derniers.

-- *l'augmentation de la glutaminémie.*

Les travaux de Waelsch (13), (127), ont montré que l'augmentation d'ammoniaque dans le sang entraînait une augmentation de la glutaminémie.

Or cette substance demande pour sa synthèse une quantité d'énergie importante sous forme de nucléotides phosphorylés. Les nucléotides ainsi utilisés seraient insuffisants ensuite pour participer à la synthèse de la phosphatidyléthanolamine.

-- *la diminution de l'acide alpha-céto-glutarique :*

Une seconde réaction perturbée par l'ammoniaque est celle catalysée par la glutamo-déshydrogénase. Dans ce cas il y aurait une grande accumulation d'acide glutamique et cela avec une diminution importante de l'acide alpha-céto-glutarique ; il en résulterait une perte d'intermédiaires dans le cycle de Krebs, d'où une diminution d'énergie (10), (9). C'est la théorie de la « déplétion du cycle de Krebs » (11), (12).

Dans les deux cas l'hyperammoniémie a abouti à un excès d'utilisation des nucléotides phosphorylés, qui peut être à l'origine du défaut de synthèse des phosphatidyléthanolamines.

Les phosphatidyléthanolamines peuvent aussi subir une transformation excessive en phosphatidylcholine.

Ce passage de l'éthanolamine vers la choline se fait par l'intermédiaire de la S-Adénosyl-Méthionine : ce n'est pas une voie habituelle et elle peut se produire dans certains cas anormaux (BREMER et GREENBERG) (23).

Cette voie pourrait être justifiée dans nos résultats :

— par la diminution des acides phosphatidiques,

— par l'augmentation des phosphatidylcholines,

— par le défaut de choline, habituel dans les comas hépatiques : ce défaut favorisant selon WILGRAM, HOLLOWAY et KENNEDY (184) la biosynthèse des phosphatidylcholines à partir des phosphatidyléthanolamines.

Cependant pour que ce mécanisme ait lieu, il faudrait que la méthylation de l'ethanolamine soit possible. ce qui paraît difficile dans un coma hépatique.

— La diminution du P. lipidique dans les cinq premières fractions peut aussi s'expliquer par une baisse des acides phosphatidiques et des inositolphosphatides.

— ANSELL et SPANNER (4), HOKIN et HOKIN (77), (79), ont montré que la transformation de phosphate en acides phosphatidiques et en inositolphosphatides est favorisée par l'acétyl-choline, celle-ci facilitant le passage des ions à travers les membranes.

Or la synthèse de l'acétyl-choline est ralentie et diminuée par l'ammoniaque, ceci a été mis en évidence par QUASTEL'S et ses collaborateurs (21) à partir de préparations de cerveaux hyperammoniémiques. Ces auteurs montrèrent en outre que cette synthèse reprenait si on ajoutait à ces préparations de l'adénosyl-tri-phosphate.

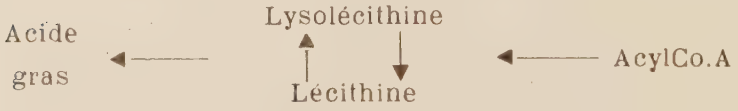
Nous pouvons donc penser que cette diminution des céphalines peut être en relation avec :

— une perturbation du métabolisme des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines.

— un défaut de synthèse des acides phosphatidiques et des inositolsphosphatides.

***

Si nous considérons enfin le schéma métabolique des lysocithines :



leur augmentation peut être due :

— à un excès de formation de phosphatidylcholines, celles-ci étant désacylées par la phospholipase A pour donner des lysolécithines. Or on sait que la phospholipase A a été mise en évidence dans les préparations de cerveau et nous avons montré qu'il existait au cours des hyperammoniémies un excès de lécithines dans l'encéphale ;

— à un défaut d'acylation des lysocithines pour redonner des lécithines.

Conclusions

L'étude chromatographique et le dosage du phosphore lipidique ont été réalisés à partir de quatre régions :

— Substance blanche sous-corticale,

— Corps calleux,

— Substance grise,

— Noyaux gris centraux,

prélevés sur des cerveaux présumés sains et des cerveaux pathologiques.

Ces derniers appartenaient à des sujets décédés après coma hépatique avec hyperammoniémie.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1°) Par fractionnement sur colonne d'acide silicique et dosage du phosphore lipidique dans les différentes fractions, nous avons montré :

— une diminution des céphalines dans la substance blanche sous-corticale des cerveaux pathologiques,

— une augmentation des lécithines dans cette même substance blanche,

— l'absence de modifications importantes dans les autres régions étudiées.

2°) Par chromatographie en couche mince, nous avons mis en évidence :

— le lieu de migration des plasmalogènes par le réactif de SCHIFF,

— l'existence de lysocithines dans la substance grise de cerveaux normaux,

— l'augmentation de ce composé dans la substance grise et sa présence dans les trois autres régions étudiées des cerveaux pathologiques.

3°) Nous avons pu retrouver des résultats identiques en étudiant le cerveau d'un chien rendu hyperammoniémique par intoxication chronique avec de l'hydroxylamine.

Une perturbation métabolique due à l'hyperammoniémie peut expliquer ces différents résultats.

VU : *Le Doyen,*

LAZORTHES.

VU et PERMIS D'IMPRIMER.

Toulouse, le 18 février 1964.

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

LOYEN

BIBLIOGRAPHIE

1 ANCHELL (M.) and WAELSCH (H.).— Higher fatty aldehydes. Isolation from small amounts of tissue with acidic carbonyl reagents. — *J. Biol. Chem.*, (1942), 145, 605-613.

2. ANSELL (G. B.) and SPANNER (S.). — Studies on cerebral sphingomyelin. — *Biochem. J.*, (1961), 79, 176-84.

3. ANSELL (G. B.) and SPANNER (S.). — The probable occurence of long chain ether analogues of phosphatidylethanolamine in brain tissue. — *Biochem. J.*, (1961), 81, 36 P.

4. ANSELL (G. B.) and SPANNER (S.). — The effects of 2 dimethyl-amino-ethanol on brain phospholipids metabolism. *J. of Neurochem.*, (1962), 9, 253-263.

5. BAER (E.) and KATES (M.). — Synthesis of enantiomeric alpha lecithines. — *J. Am. Chem. Soc.*,(1950), 72, 942-947.

6. BAER (E.). — Synthesis of eniantiomeric alpha phosphatidic acids. — *Biochem. J.*, (1951), 189, 235-239.

7. BAER (E.), MAURUKAS (J.) and RUSSEL (M.). — Synthesis of enantiomeric alpha-céphalines. — *Science*, (1951), 113, 12-13.

8. BALAKRISHNAN (S.),GOODWIN (H.) and CUMINGS (J. N.). — The distribution of phosphorus containing lipids in the human brain. — *J. of Neurochem.*, (1961), 8, 276-280.

9. BESSMAN (P. Samuel). — Ammonia metabolism in animals In : MAC ELROY (W. B.) and GLASS (B.), Inorganic nitrogen métabolism, (1956), Edited by Folch-Pi, Maryland.

10. BESSMAN (P. Samuel). — Ammonia and coma. In : Chemical pathology of the nervous system. — (1958), Edited by Folch-Pi, Wawerley.

11. BESSMAN (S. P.), FAZEKAS (J. F.) and BESSMAN (A. N.). —Uptake of ammonia by the brain in hepatic coma. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1954), 85, 66-7.

12. BESSMAN (S. P.) and BESSMAN (A. N). — Cerebral and peripheral uptake of NH in liver disease with an hypothesis for mechanism of hepatic coma. — *J. of Clinic. Invest.*, (1955), 34, 622-625.

13. BESSMAN (S. P.), MAGNES (J.), SCHWERIN (P.), WAELSCH (H.). — The absorption of glutamic acid and glutamine. *J. Biol. Chem.*, (1949), 175, 817-820.

14. BIETH (R.), FREYSZ (L.) et MANDEL (P.). — Etude quantitative des divers composés phosphatidyl et phosphatidal du cerveau de rat au cours de la croissance post-natale. *Biochim. Biophys. Acta*, (1961), 53, 576-578.

15. BIETH (R.), FREYSZ (L.), NUSSBAUM (J.-L.) et MANDEL (P.). — Incorporation du ^{32}P dans les phosphatidyl et phosphatidal composés du cerveau de rat au cours de la croissance. *Biochim. Biophys. Acta*, (1962), 58, 584-585.

16. BIRAN (L. A.) and BARTLEY (W.). — Distribution of fatty acids in lipids of rat brain, brain mitochondria and microsomes. — *Biochem. J.* (1961), 79, 159-176.

17. BLANC (P.). — Contribution à l'étude chimique pharmacodynamique et toxicologique du nitrite de sodium (1946), *Thèse de Sciences*. Toulouse.

18. BORGSTROM (B.). — Lipids separation méthods. Separation of phospholipids from neutral fat and fatty acids. *Acta Physiol. Scand.*, (1952), 25, 101-110.

19. BORGSTROM (B.). — Investigation on lipid separation methods. Separation of cholesterol esters, glycerides and free fatty acids. *Acta Physiol. Scand.*, (1952), 25, 111-120.

20. BORGSTROM (B.). — Intestinal absorption and distribution of fatty acids and glycerids in the rat metabolism of lipids. — *Acta Physiol. Scand.*, (1952), 25, 130-139.

21. BRAGANCA (B. M.), FAULKNER (P.) and QUASTEL (J. H.). — Effects of inhibitors of glutamine synthesis on the inhibition of acetyl-choline synthesis in brain slices by ammonium ions. — *Biochim. Biophys. Acta*, (1953), 10, 83-88.

22. BRANTE (G.). — Studies on lipids in the nervous system with special reference to quantitative chemical determination and topical distribution. — *Acta Physiol. Scand.*, (1949), 18, Suppl. 63, 189 + XXIV pp.

23. BREMER (J.) and GREENBERG (D.M.). — Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (Phosphatidylcholine). — *Biochim. Biophys. Acta*. (1961). 46, 205-216.

24. CARTER (H.), GLICK (F. J.), NORRIS (W. P.) and PHILIPS (G. E.).— The structure of sphingosine. — *J. Biol. Chem.* (1942), 142, 449-450.

25. CARTER (H.E.), SMITH (D.B.) and JONES (D.N.). — A new ethanolamine-containing lipid from egg yolk. — *J. Biol. Chem.*, (1958), 232, 681-694.

26. CHIBNALL (A. C.). and CHANNON (H. J.). — Ether-soluble substance of cabbage-leaf cytoplasm. — *Biochem. J.*, (1929), 23, 176-183.

27. CLARKE (D.D.), MYCEK (M.J.), NEIDLE (A.) and WAELSCH (H.). — Incorporation of amines inta proteins. — *Arch. Biol. Biophys.*, (1959), 79, 338-342.

28. COLE (P.G.), LATHE (G.H.) and RUTHVEN (C.R.J.). — The application of counter-current methods to the fractionation of lipid material from brain. — *Biochem. J.*, (1953), 54, 449-457.

29. COLLINS (F.D.). — Studies on phospholipids. 10. Anomalous counter-current distributions. — *Biochem. J.*, (1963), 89, 177-181.

30. CUMINGS (J.N.). — The diagnostic value of lipid estimations in the cerebral lipidoses — In : *Cerebral lipidoses, a symposium*, (1957), Edit. L. von Bogaert, London.

31. CUMINGS (J.N.). — The cerebral lipids in disseminated sclerosis and in amaurotic family idiocy. — *Brain*, (1953), 76, 551-562.

32. CUMINGS (J.N.). — Lipid chemistry of the brain in demyelinating diseases. — *Brain*, (1953), 78, 554-563.

33. CUMINGS (J. N.), GOODWIN (H.), WOODWARD (F. M.) and CURZON (G.). — Lipids in the brain of infants and children. — *J. of Neurochem.*, (1958), 2, 289-294.

34. DANIELLI (J.F.). — Surface chemistry and cell membranes. In : Surface Chemistry in Biology and Medicine, (1958), Edit. Danielli, *J. F. Pankhurst*, A. C. Pergamon, London.

35. DAVISON (A. N.), DOBBING (J.), MORGAN (R. S.), WAJDA (M.) and PAYLING WRIGHT (G.). — The Turnover of lipids in brain in vivo. — *Proc 5th. Intern. Conf. — Biochem. Probl. Lipids*, (1960). — Edit. G. Popjak, Pergamon, London.

36. DAVISON (A.N.), MORGAN (R.S.) and PAYLING WRIGHT (G.). — Metabolism of myelin lipids : incorporation of ^{14}C serine in brain lipids of the developing rabbit and their persistence in the central nervous system. — *J. of Neurochem.*, (1959), 4, 360-365.

37. DAVISON (A.N.) and WAJDA (M.). — Metabolism of myelin lipids : estimation and separation of brain lipids in the developing rabbit. — *J. of Neurochem.*, (1959), 4, 353-359.

38. DAVISON (A. N.) and WAJDA (M.). — Analysis of lipids from fresh and preserved adult human brains. — *Biochem. J.*, (1962), 82, 113-117.

39. DAVISON (A. N.) and WAJDA (M.). — Cerebral lipid in multiple sclerosis. — *J. of Neurochem.*, (1962), 9, 427-432.

40. DAWSON (R.M.C.). — The role of glycerylphosphorylcholine and glycerylphosphoryléthanolamine in liver phospholipid metabolism. — *Biochem. J.*, (1955), 59, 5-8.

41. DAWSON (R. M. C.). — Studies on the phosphorylcholine of rat liver. — *Biochem. J.*, (1956), 62, 693-696.

42. DAWSON (R.C.M.). — An hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. — *Biochem. J.*, (1960), 75, 45-53.

43. DEBUCH (H.). — Chemical constitution of acetalphosphatide and the occurence of colamine-céphalins in brain. — *Hoppe Seyler's, Z. Physiol. Chem.*, (1956), 304, 109-137.

44. DELSAL (J.L.) et MANHOURI (H.). — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographies. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1955), 37. 1041-1054.

45. DEMOLE (E.). — Application de la microchromatographie d'absorption sur couche mince. — *J. Chromatog.*, (1958), 1, 24-34.

46. — DEMOLE (E.). — Progrès récents de la microchromatographie sur couches minces. — *J. Chromatog.*, (1961), 6, 2-21.

47. DEUEL (H.J.). — The lipids : Their chemistry and biochemistry. (1951, 1957). — *Interscience*, New-York.

48. DITTMER (J.C.) and DAWSON (R.M.C.). — The isolation of a new lipid triphosphoinositide and monophosphoinositide from ox brain. — *Biochem. J.*, (1960), 75, 45-53.

49. DOUSTE-BLAZY (L.), POLONOVSKI (J.) et VALDIGUIE (P.). — Chromatographie sur papier des phospholipides. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1956), 38, 19-33.

50. DOUSTE-BLAZY (L.). — Fractionnement des lipides du sérum par distribution à contre-courant. — *C. R. Acad. Sci.*, (1954), 239, 460-462.

51. ENG (L.F.), (Y.L.) LEE, (R.B.) HOGMAN and (B.) GERSTL. — Separation and isolation of methyl-esters and dimethylacetals formed from brain lipids. — *J. of lipid Research*, (1964), 5, 128-132.

52. FAURE (M.) and MORELEC-COULOM (M.). — Isolation of a crystallisable phosphatide from the ox cardiac muscle : glycero-inositophosphatide. — *C. R. Acad. Sci.*, (1954), 238. 411-412.

53. FAVARGER (P.). — Participation of phospholipids in the absorption of fats from different regions of the intestine of dog. — *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, (1949), **7**, 371-381.

54. FEULGEN and ROSSENBECK. — Microchemical test for nucleic acid of the thymonucleic acid type and the selective staining of cell nucleic in microscopic preparations. — *Physiol. Chem.*, (1924), 135, 203-248.

55. FINEAN (J.B.). — X-Ray diffraction studies on the polymorphism of phospholipids. — *Biochim. Biophys. Acta*, (1953), 10, 371-384.

56. FISKE (C.H.) and SUBBAROW. — The colorimetric determination of phosphorus. — *J. Biol. Chem.*, (1925), 66, 375-384.

57. FLEURY (P.), COURTOIS (J. E.) et MALANGEAU (P.). — Sur l'emploi de la chromatographie sur papier pour la séparation du mesoinositol d'avec le scillitol et leur caractérisation. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1953), 35, 537-540.

58. FOLCH (J.). — In Psychiatric research. — (1947), Harvard University Press, *Cambridge Mos.*

59. FOLCH (J.). — Brain disphophoinositide. A new phosphatid having inositol metadiphosphate as a constituent. — *J. Biol. Chem.*, (1949), 177, 505-519.

60. FOLCH (J.). — Complete fractionation of brain cephaline. Isolation from it of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and diphosphoinositide. — *J. Biol. Chem.*, (1949), 177, 497-504.

61. FOLCH (J.), ASCOLI (I.), LEES (M.), MEATH (J. A.) and LE BARON (F.N.). — Preparation of lipid extracts from brain tissue. — *J. Biol. Chem.*, (1951), 191, 833-841.

62 FOLCH (J.) and LEES (M.). — Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. Their isolation from brain. — *J. Biol. Chem.*, (1951), 191, 807-17.

63. FOLCH (J.), LEES (M.) and SLOANE STANLEY (G. H.). — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. — *J. Biol. Chem.*, (1957), 226, 497-509.

64. FOLCH (P.) and SPERRY (W. M.). — Chemistry of lipids. — *Ann. Rev. Biochem.*, (1948), 17, 169-200.

65. FOLCH (J.) and WOOLLEY (D.W.). — Inositol, a constituent of a brain phosphatid. — *J. Biol. Chem*, (1942), 142, 963-964.

66. FREYSZ (L.), (J.L.) NUSSBAUM, (R.) BIETH et (P.) MANDEL. — Evolution des divers phosphatides du cerveau au cours de la croissance chez le rat. — *J. Physiol.*, (1961), 53, 341-342.

67. GABUZDA (G. J.), PHILLIPS (G. B.) and DAVISON (C. S.). — Nutritive adequacy and clinical tolerance of modified human globin. — *J. of Clin. Invest.*, (1953), 32, 899-908.

68. GABUZDA (G.J.), PHILLIPS (G.B.), SHILLING (R.) and DAVIDSON (C. S.). — Metabolism of pteroylglutamine acid and citrovarum factor in patients with scurvy. — *J. Clin. Invest.*, (1952), 31, 756-761.

69. GALLAI-HATCHARD (J.), MAGEE (W.L.), THOMPSON (R.H.S.) and WEBSTER (G. R.). — The formation of lysophosphatides by brain preparations. — *J. of Neurochem.*, (1962), 9, 545-554.

70. HAJRA (Amira) and RADIN (N.S.). — Isolation of sphingolipids. — *J. of lipid Research.*, (1963), 4, 440-455.

71. HANAHAN (D.J.). — Lecithinases. — *Prog. in Chem. Fats lipids*, (1957), 4, 141-176.

72. HANAHAN (D. J.), DITTMER (J. C.) and WARASHINA (E.). — A column chromatographic separation of classes of phospholipids. — *J. Biol. Chem.*, (1957), 228, 685-700.

73. HANAHAN (D. J.) and OLLEY (J. N.). — Chemical nature of monophosphoinositides. — *J. Biol. Chem.*, (1958), 231, 813-827.

74. HANES (C.S.) and ISHERWOOD (F.A.). — Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatograms. — *Nature*, (1949), 164, 1107-1112.

75. HIRN, BERNHARD (K.) and LESCH (P.). — Fatty acid composition of cerebrosides, sphingomyelines and lecithins from human brain. — *Helv. Chim. Acta*, (1963), 46, 1798-1801.

76. HOFMANN (Alan F.). — Thin-layer adsorption chromatography of lipids. — *In : Biochemical problems of lipids.* (1963). Edit. by A. C. Frazer, Birmingham.

77. HOKIN (L. E.) and HOKIN (M. R.). — Effects of acetylcholine on phosphate turnover in phospholipids of brain cortex in vivo. — *Biochim. Biophys. Acta*, (1955), 16, 229-237.

78. HOKIN (L. E.) and HOKIN (M. R.). — Acetyl-choline and the exchange of inositol and phosphate in brain phosphoinositide. — *J. Biol. Chem.*, (1959), 233, 818-821.

79. HOKIN (L.E.) and HOKIN (M.R.). — Phosphate exchange in phosphatidic acid in response to acetyl-choline. — *J. Biol. Chem.*, (1959), 234, 1387-1390.

80. HONEGER (C. G.). — Preparative thin-layer chromatography. — *Helv. Chim. Acta*, (1962), 45, 1409-15.

81. HORHAMMER (L.), WAGNER (H.) und HOLZL (J.). — Uber die Inositphosphatide des Rinderhirns und des Sojabohne. — *Biochem. Z.*, (1958), 330, 591-594.

82. HORHAMMER (L.), WAGNER (H.) und HOLZL (J). — Uber die Inositphosphatide des Rinderhirns. — *Biochem. Z.*, (1960), 332, 269-276.

83. HORROCKS (L.A.). — Thin-layer chromatography of brain phospholipids. — *J. of Lipid Research.*, (1964), 5, 142-145.

84. JATZKEWITZ (H.) und MEHL (E.). — Zür Dünnschicht Chromatographie des Gehirn Lipoide. — *Z. Physiol. Chem.*, (1960), 320, 134-148.

85. JAVILLIER (M.) et DJELATIDES (D.). — Mesure volumétrique du phosphore et son application aux analyses biologiques. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1928), 10, 342-353.

86. JOHNSON (A.C.), MAC NABB (A.R.) and ROSSITER (R.J.). — Lipids of peripheral nerve. — *Biochem. J.*, (1948), 43, 578-580.

87. — JOHNSON (A.C.), MAC NABB (A.R.) and ROSSITER (R.J.). — Concentration of lipids in the brain of infants and adults. — *Biochem. J.*, (1949), 44, 494-498.

88. KAHANE (E.). — Communication personnelle.

89. KAUFMAN (H.P.), MAKUS (Z.) und DEICKE (F.). — Die Dünnschicht Chromatographie auf dem Fettgebiet : II. Trennung von Cholesterol Fettsaüre Estern. — *Fette, Seifen, Austrichmittel*, (1961), 63, 294-298.

90. KEENAN and HOKIN (L.E.). — The identification of lysophosphatidylinositol and its enzymic conversion to phosphatidylinositol. — *Biochim. Biophys. Acta*, (1962), 60, 428-430.

91. KENNEDY (E.P.), BORKENHAGEN (L.F.) and SMITH (S.W.). — Possible metabolic functions of deoxycytidine diphosphate choline, and deoxycytidine diphosphate ethanolamine. — *J. Biol. Chem.,* (1959), 234, 1998-2000.

92. KENNEDY (E.P.) and WEISS (S.B.). — The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. — *Biochem. J.,* (1956), 222, 193-214.

93. KISHIMOTO (Y) and RADIN (N.S.). — Isolation and determination method for brain cerebrosides, hydroxyfatty acids and unsaturated and saturated fatty acids. — *J. of Lipid Research,* (1959), 1, 72-78.

94. KISHIMOTO (Y.) and RADIN (N.S.). — Structures of the normal unsatured fatty acids of brain sphingolipids. — *J. of Lipid Research,* (1963), 4, 40, 437-443.

95. KLENK (E.) and HENDRICKS (U.W.). — An inositol phosphatide-containing carbohydrate isolated from human brain. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1961), 50, 602-603.

96. KOREY (S.R.) and ORCHEN (M.). — Plasmalogens of the nervous system. Deposition in developing rat brain and incorporation of carbon 14 isotope from acetate and palmitate into the alpha-beta unsaturated ether chain. — *Arch. Biochem. Biophys.,* (1959), 83, 381-389.

97. LABBE et FABRIKANT. — Le Phosphore. (1933). Masson édit., Paris.

98. LEA (C.H.) and RHODES (D.N.). — Phospholipins partition chromatography of egg-yolk phospholipins on cellulose. — *Biochem. J.,* (1953), 54, 467-469.

99. LEA (C.H.), RHODES (D.N.) and STOLL (R.D.). — Phospholipids. 3. On the chromatographic separation of glycerophospholipids. — *Biochem. J.,* (1955), 60, 353-363.

100. LE BARON (F.N.) and FOLCH (J). — Structure of brain tissue lipids. — *Physiol. Rev.,* (1957), 37, 539-548.

101. LE BARON (F. N.) and LEES (M.B.). — The effects of acetone, methanol or trichloroacetic acid on extraction of proteolipids and phosphatidopeptides from brain tissue. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1962), 60, 412-414.

102. LE BARON (C.P.), MAC DONALD (B) and SRIDHARA RAMA-RAO. — The amounts and distribution of free inositol and proteine bound phosphoinositides in brain tissues. — *J. of Neurochem.,* (1963), 10, 677-682.

103. LEGRAND (J.L.). — Essai d'application de la chromatographie en couche mince à quelques lipides biologiques. — Thèse de Pharmacie, Toulouse, (1963).

104. LEVENE and ROLL (I.P.). — Preparation and purification of lecithines and cephalines. — *J. Biol. Chem.,* (1927), 72, 587-595.

105. LEVI (G.). — Studio al microscopio electronico della guaina mielinica del midollo spinale dopo trattamento con formolina e cloroformio-metanolo. — *Boll. del Soc. Ital. Biol. Sper.,* (1953), 39, 19, 1108-1113.

106. LIS ELAINE (W.), TINOCO (J.) and OKEY (R.). — A micro-method of fractionation of lipids by silicic acid chromatography. — *Analytical Biochemistry,* (1961), 2, 100-106.

107. LOGAN (J. E.), MANNEL (W. A.) and ROSSITER (R. J.). — Estimation of nucleic acids in tissue from the nervous system. — *Biochem. J.,* (1952), 51, 470-482.

108. LONG (C.) and OWENS (K.). — The chromatographic behaviour of phosphatidyl inositol (monophosphoinositide). — *Biochem. J.,* (1962), 85, 34 P.

109. LONG (C.), SHAPIRO (B.) and STAPLES (D.A.). — Chromatographic separation of serine-containing phospholipids of rat brain. — *Biochem. J.,* (1960), 75, 17 P.

109 bis. LONG (C.) and STAPLES (D.A.). — Chromatographic isolation of the ethanolamine-containing phospholipids of rat brain. — *Biochem. J.,* (1962), 75, 16 P.

110. LUCAS (C.C.), PATTERSON (J.M.) and RIDOUT (J.G.). — Solubility of tissue phosphatides in acetone. — *Arch. Biochem. Biophys.,* (1958), 78, 546-554.

111. MACHEBŒUF (M.). — Méthodes permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang. — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* (1926), 8, 464-468.

112. MACHEBŒUF (M.). — Proportions de phosphore contenues dans les divers constituants du sang normal. — Méthodes de dosage. — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* (1927), 9, 94-98.

113. MACHEBŒUF (M.). — Etat des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. — (1937), Hermann Edit., Paris.

114. MACHEBŒUF (M.) et VANAUD (H.). — Etude sur l'électrophorèse des cénapses lipido-protidiques du sérum sanguin. Les cénapses acido-précipitables. — *C. R. Soc. Biol.* (1941), 135, 1249-1950.

115. MAC ARDLE (B.), THOMPSON (R.H.S.) and WEBSTER (G.R.). — The action of lecithine and of snake venom on whole cell preparations of brain, muscle and liver. — *J. of Neurochem.*, (1960), 2, 135-142.

116. MAC ILWAIN (H). — Chemical exploration of the brain (membrane, structure and properties of membrane constituents), (1963). Elsevier Publishing Company, London.

117. MAC ILWAIN (H.) and RODNIGHT. — Practical neurochemistry, (1962). — Churchill, London.

118. MAC KIBBIN (J. M.). — A monophosphoinositide of liver. — *J. Biol. Chem.* (1956), 220, 537-545.

119. MANERY (J.F.). — In : Biology of mental health disease. (1952), Hober, New-York.

120 MARINETTI (G. V.), ERBLAND (J.), ALBRETCHT (M.) and STOTZ (E.). — In vitro incorporation of ^{32}P labelled orthophosphate into the phosphatides of isolated rat liver mitochondria. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1957), 26, 130-133.

121. MARINETTI (G. V.), ERBLAND (J.) and STOTZ (E.). — Separation of ionic forms of phosphatidylserine by column chromatography. — *Biochim. Biophys. Acta* (1958), 30, 41-43.

122. MARINETTI (G. V.), ERBLAND (J.) and STOTZ (E.). — Hydrolysis of lecithines by snake venom phospholipase A. — *Biochim. Biophys. Acta* (1959), 33, 403-414.

123. MARINETTI (G. V.) and STOTZ (E.). — Paper chromatographic separation of phospholipids. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1956), 21, 168-170.

124. MARPLES (E.A.), THOMPSON (R.H.S.) and WEBSTER (G.R.). — The liberation of active enzymes from brain tissue by lysolecithine. — *J. of Neurochem.*, (1959), 4, 62-70.

125 MOORE (St) and STEIN (W. H.). — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids. — *J. Biol. Chem.*, (1948), 176, 367-385.

126. MORRISSON (L. R.) and ZAMECNICK (P. C.). — Experimental demyelination by means of enzymes, especially the alpha toxin of clostridium Welchii. — *Archiv. Neurol. Psychia.*, (1950), 63, 367-381.

127. NEIDLE (A.), MYCEK (M.J.), CLARKE (D.D.) and WAELSCH (H.). — Enzymatic exchange of protein amide groups. — *Archiv. Biochem. Biophys.*, (1958), 77, 229-232.

128. NEMER (M.J.) and ELWYN (D.). — Conversion of serine to ethanolamine and its derivatives in the rat. — *J. Biol. Chem.*, (1960), 235, 2070-74.

129. NUSSBAUM (J. L.), BIETH (R.) et MANDEL (P.). — La répartition des phospholipides dans les mitochondries, les microsomes et les gaines de myéline du cerveau de rat. — Congrès de Chimie Biologique de Strasbourg (1963).

130. ORD (M.G.) and THOMPSON (R.H.S.). — The preparation of soluble cholinesterases, from mammalian heart and brain. — *Biochem. J.*, (1951), 49, 191-199.

131. PANGBORN (M.C.). — Preparation of cardiolipin and lecithin. Lecithin. — N. Y. State Dept. Health, *Ann. Rept. Div. Lab. Research,* (1947), 20-1.

132. PANGBORN (M. C.). — A simplified purification of lecithine. — *J. Biol. Chem.*, (1951), 188, 471-476.

133. PAPADOPOULOS (N. M.), CEVALLOS (W.) and HESS (W. C.). — Determination of phospholipids in spinal fluid and brain. — *Archiv. of Neurol.*, (1960), 3, 677-680.

134. PAPADOPOULOS (N. M.) and RICHMOND (Ph. D.). — Chromatographic analysis of brain phospolipids. — *Archiv. of Neurol.*, (1963), 8, 340-343.

135. PAULUS (H.) and KENNEDY (E.P.). — Function of cytidine disphophate diglyceride in the enzimic synthesis of inositol monophosphatide. — *J. Am. Chem. Soc.*, (1958), 81, 4436-4437.

136. PAULUS (H.) and KENNEDY (E.P.). — Enzimic synthesis of inositol monophosphatide. — *J. Am. Chem. Soc.*, (1958), 80, 6689-6690.

137. PHILLIPS (G. B.). — Isolation and quantitation of the principle phospholipid components of human serum using chromatography on silicic acid. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1958), 29, 594-602.

138. PHILLIPS (G. B.). — Lipid composition of human bile. — *Bioch. Biophys. Acta,* (1960), 41, 361-363.

139. PIGHINI (G.) and DELFINI (D.). — Lysolecithine in the brain of the guinea pig. — *Bioch. Terap. sper.*, (1931), 18, 56-63.

140. POLONOVSKI (J.). — Le rôle des lipides dans les systèmes enzymatiques. — *Exp. Ann. Biol. Medic.*, (1955), 17, 319-326.

141. POLONOVSKI (J.) et DOUSTE-BLAZY (L.). — Fractionnement des phospholipides plasmatiques. — *In : Biochem. Problems of lipids*, (1956), *Butterworks, London.*

142. POLONOVSKI (J.), ETIENNE (J.), PAYSANT (M.) et PETIT (M.) — Fractionnement chromatographique des phospholipides plasmatiques. — *Ann. Biol. Clin.*, (1959), 17, 186-189.

143. POLONOVSKI (J.) et GAY (A.). — Importance des lipides dans le système succinoxydasique. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1956), 38, 475-480.

144. RADIN (N. S.), LAVIN (F. B.) and BROWN (J. R.). — Determination of cerebrosides. — *J. Biol. Chem.*, (1956), 217, 789-796.

145. RAPPORT (M.) and FRANZL (R. E.). — Structure of plasmalogens. The nature and significance of the aldehydogenic linkage. — *J. Neurochem.*, (1957), 1, 303-310.

146. RAPPORT (M.) and FRANZL (R. E.) — Hydrolysis of phosphatidal cholin by lecithinase A. — *J. Biol. Chem.*, (1957), 225, 851-857.

147. REITSEMIA (R. H.). — Characterisation of essential oils by chromatography. — *Anal. Chem.*, (1954), 26, 960-963.

148. RATHBONE (L.). — Some observations on the chromatographic behaviour of phosphatidylserine. — *Biochem. J.*, (1962), 85, 461-466.

149. RHODES (D.N.) and LEA (C.H.). — Phospholipids 4. On the composition of hen's egg phospholipids. — *Biochem. J.*, (1957), 65, 526-533.

150. RODNIGHT (R.). — Cholesterol and cerebrosides in brain specimens preserved for long period in formalin. — *J. of Neurochem.*, (1957), 1, 207-215.

151. ROSSITER (R. J.). — Chemical constituents of brain and nerve. — In : PAGE (I. H.), ELLIOT (K. A. C.), QUASTEL (J. H.), *Neurochemistry* 1955, Charles C. Thomas Publisher, New-York.

152. ROSSITER (R. J.) and STRICKLAND (K. P.). — Biogenesis of phosphatides and triglycerides. — *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, (1959), 72, 790-802.

153. ROUSER (G.), BAUMAN (A. J.) and KRITCHERSKY (G.). — New methods for the separation and quantitative isolation of lipids. Initial applications to the study of beef brain and spleen lipids in Gaucher's disease. — *Am. J. Clin. Nutrition*, (1961), 9, 112-123.

154. ROUSER (G.), O BRIEN (J.) and HELLER (D.). — The separation of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine by column chromatography. — *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, (1961), 38, 14-19.

155. ROUSER (G.) and SCHLOREDT (D.). — Fatty acid composition of the active phosphatidyléthanolamine. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1958), 28, 81-89.

156. ROUSER (G.), WHITE (S.) and SCHLOREDT (D.). — Phosphopholipid structure and thromboplastic activity. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1958), 28, 71-80.

157. RUSSEL (J. H.). — Thin-layer chromatography. — *Rev. Pure Applic. Chem.,* (1963), 13-15.

158. SCHLEMMER. (W.). — Détermination des phosphatides par chromatographie sur couche mince de gel de silice. — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.,* (1961), 37, 134-137.

159. SCHWARTZ (R.), PHILLIPS (G. B.), GABUZDA (C. J.) and DAVIDSON (C. S.). — Blood ammonia and electrolytes in hepatic coma. — *J. Lab. Clin. Medic.,* (1953), 42, 499-508.

160. SKIPSKI (V. P.), PETERSON (R. F.) and BARCLAY (M.) — Separation of phosphatidylethanolamine phosphatidylserine and other phospholipid by thin-layer chromatography. — *J. of Lipid Research,* (1962), 3, 467-70.

161. SKIPSKI (V.)P.), PETERSON (R. F.), SANDERS (J). et BARCLAY (M.). — Thin-layer chromatography of phospholipids using silica gel without column sulfate binder. — *J. Lipid Research,* (1963), 4, 227-230.

162. SMITH (R. H.). — The Phosphatides of the latex of heveâ brasiliensis. Purification and analysis. — *Biochem. J.,* (1954), 57, 130-139.

162 bis SOULA (G.). — Contribution à l'étude des lipides globulaires de l'homme. — Thèse de pharmacie (1963), Toulouse.

163. STICKLAND (K. P.), THOMPSON (W.)., SUBRAHMANYAN (D.) and ROSSITER (R. J.). — Studies on the biosynthesis of brain inositolphosphatide. — *Biochem. J.,* (1960), 76, 41 P.

164. SVENNERHOLM (L.). — Composition of gangliosides from human brain. — *Nature,* (1956), 177, 524-525.

165. SVENNERHOLM (L.) and THORIN (H.). — Isolation of cephalin B from cerebral lipids. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1960), 41, 371-372.

166. SWEELEY (Ch.C.). — Purification and partial caracterization of sphingomyelin from human plasma. — *J. of Lipid Research.*, (1963), 4, 402-409.

167. THANNHAUSER (S. J.) and BONCODDO (N. F.). — Isolation and identification of hydrolecithine (dipalmityl-lecithine) from brain and spleen. — *J. Biol. Chem.*, (1948), 172, 135. -139.

168. THANNHAUSER (S.J.), BONCODDO (N.F.) and SCHMIDT (G.). — Acetalphospholipids from brain ; procedure for isolation of cristallized acetalphospholipids from brain. — *J. Biol. Chem.*, (1951), 188, 417-421.

169. THANNHAUSER (S.J.), BONCODDO (N.F.) and SCHMIDT (G.). — The structure of acetalphospholipids of brain. — *J. Biol. Chem.*, (1951), 188, 423-427.

170. THIERFELDER (H.) und KLENK (E.). — Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. — 1930, J. Springer, Berlin.

171. THOMPSON (R.H.S.), NIEMERO (R.) and WEBSTER (G.R.). — The identification of lysolecithine in lipids extracts of brain. — *Biochim. Biophys. Acta,* (1960), 43, 142-144.

172. THUDICHUM (J.L.). — A treatise on the chemical constitution of the brain. — 1884, Baillière, Turdall and Cox, London.

173. THUDICHUM (J. L.). — Die chemische Konstitution der Gehirns des Menschen und des Tiere. — (1901), Tubingen, Dietzeken.

174. TRAGER (W.). — The effects of lysolecithine on the growth of lactobacillus casei in relation to biotin, pantothenic acid, and fat soluble materials with biotine activity. — *J. Bact.*, (1948), 56, 195-199.

175. UNDERHILL (F.P.) and KOPSINOW (R.). — The comparative toxicity or ammonium salts. — *J. Biol. Chem.*, (1922), 54, 451-460.

176. VIOQUE (J.) and HOLMAN (R.T.). — Determination of esters by thin-layer chromatography. — *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, (1962), 39, 63-66.

177. WAGNER (H.). — Thin-layer chromatography. — *Mitt. Gehiete Lebenau u Hyg.*, (1960,, 51, 416-423.

178. WAGNER (H.). — Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und analytik von Phosphatiden und Glykolipiden. — *Fette, Seigen Austrichmittel,* (1960), 62, 1115-1123.

179. WAGNER (H.), HORHAMMER (L.) et WOLF (P.). — Dünnschicht-chromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. — *Biochem. Z.*, (1961), 334, 175-184.

180. WAGNER (H.), LISSON (A.), HOLZL (J.) und HORHAMMER (L.). — Uber den ^{32}P Einbau in die Inositphosphatides der rattenhirns. — *Biochem. Z.*, (1961), 335, 312-314.

181. WEBSTER (G. R.). — Clearing action of lysolecithine on brain homogenates. — *Nature*, (1957), 180, 660-661.

182. WEBSTER (G. R.) and THOMPSON (R. H. S.). — Observation on the presence of lysolecithine in nervous tissue. — *Biochim. Biophys. Acta*, (1962), 63, 38-45.

183. WHERRET (J. R.) and MC ILWAIN (H). — Gangliosides, phospholipids, protein and ribonucleic acid in subfractions of cerebral microsomal material. — *Biochem. J.*, (1962), 84, 232-237.

184. WILGRAM (G. F.), HOLLOWAY (C. F.) and KENNEDY (E. P.). — Content of cytidine diphosphate choline in the livers of normal and choline deficient rats. — *J. Biol. Chem.*, (1960), 235, 37-39.

185. WILSON (J. D.), GIBSON (K. D.) and UDENFRIEND. — Conversion in vitro of serine to ethanolamine by rat liver and brain. — *J. Biol. Chem.*, (1960), 235, 3539-3543.

186. WITTEMBERG (J. B.),(S. R.), KOREY and SWENSON (F. H.). — The determination of higher fatty aldehydes in tissues. — *J. Biol. Chem.*, (1956), 219, 39-47.

187. YAMAZOE (K.), KAYASHI and KANOH (I.). — Studies on brain phospholipids with special reference to phosphatidic acid. — *In : Biochem. Problems of lipids*, (1963), 1, Edit. by A. C. Frazer, Birmingham.

188. ZIPPER (H.) and GLANTZ (M.D.). — Paper electrophoretic separation of phosphatides. — *J. Biol. Chem.*, (1958), 230, 621-624.

TABLE des MATIERES

INTRODUCTION 1

TRAVAUX ANTERIEURS 3

A) Distribution anatomique des phospholipides de l'encéphale 3

B) Etude chimique des différents phospholipides du cerveau 8

I. — Glycérophospholipides 8

1) Acides phosphatidiques 8
2) Céphalines 9
3) Lécithines 14
4) Plasmalogènes 18

II. — Sphingomyélines 19

C) Répartition des phospholipides dans le cerveau selon l'âge 21

TRAVAUX PERSONNELS 25

CHAPITRE PREMIER.

EXPOSÉ DES TECHNIQUES 26

A) Prélèvement 26

B) Extraction 29

C) Purification de l'extrait lipidique 31

D) Isolement des phospholipides 35

1) Précipitation par l'acétone 35

2) Fractionnement sur colonne d'acide silicique. 37

E) Estimation quantitative des phospholipides 41

F) Séparation des phospholipides 43

1) Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique 44

2) Chromatographie sur plaque imprégnée d'acide silicique 45

3) Avantages et inconvénients des procédés de chromatographie utilisés 46

G) Détermination qualitative des phospholipides . . 47

I. — Colorations spécifiques 47

II. — Identification par substances témoins 51

1) Phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines 52

2) Inositides 54

3) Plasmalogènes 56

4) Lécithines 56

5) Sphingomyélines 56

6) Lysophosphatides 57

CHAPITRE II.

RÉSULTATS 59

I. — *Fractionnement de cerveaux de bœuf* 59

A) Dosage du Phosphore lipidique 59

B) Chromatographie sur papier 60

II. — *Fractionnement des phospholipides de cerveaux humains normaux* 64

A) Préparation des extraits 64

B) Substance blanche 65

1) Chromatographie sur colonne 65
2) Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique 70
3) Chromatographie en couche mince . . 73

C) Corps calleux 77

1) Chromatographie sur colonne 77
2) Chromatographie en couche mince . . 79

D) Substance grise 81

1) Chromatographie sur colonne 81
2) Chromatographie sur papier 85
3) Chromatographie en couche mince . . 87

E) Noyaux gris centraux 89

1) Chromatographie sur colonne 89
2) Chromatographie en couche mince . . 92

F) Comparaison de nos résultats 94

III. — Fractionnement de cerveaux pathologiques. 97

A) Substance blanche 98

1) Chromatographie sur colonne 98
2) Chromatographie sur papier 102
3) Chromatographie en couche mince . . 104

B) Corps calleux 106

1) Chromatographie sur colonne 106
2) Chromatographie en couche mince . . 109

C) Substance grise 110

1) Chromatographie sur colonne 110
2) Chromatographie en couche mince . . 112

D) Noyaux gris centraux 114

1) Chromatographie sur colonne 114

2) Chromatographie en couche mince . . 117

E) Etude des lysocithines 119

F) Comparaison de nos résultats 121

IV. — *Experimentation chez le chien* 124

A) Choix du produit 124

B) Fractionnement comparatif des phospholipides cérébraux 126

1) Conduite de l'expérimentation 126

2) Fractionnement sur colonne 128

3) Chromatographie en couche mince . . 132

CHAPITRE III.

DISCUSSION DES RÉSULTATS 139

CONCLUSIONS 145

BIBLIOGRAPHIE 147

Imprimerie PEZOUS
32, Place Jean-Jaurès
ALBI